

Studien zur Kinetik der Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium

(dr. rer. nat.)
im Fach Biophysik

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Humboldt-Universität zu Berlin

von
Herr Dipl.-Phys. Andreas Johannes Modler
geboren am 01.11.1971 in Konstanz

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:
Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter:

1. Prof. Dr. Gregor Damaschun
2. Prof. Dr. Hermann-Georg Holzhütter
3. Prof. Dr. Rainer Jaenicke

eingereicht am: 14. August 2003
Tag der mündlichen Prüfung: 23. Oktober 2003

Man kennt nur die Dinge, die man zählt.

Antoine de Saint-Exupéry,
Der kleine Prinz

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abstract	vi
Zusammenfassung	viii
Abkürzungen, Symbole und Notation	x
1. Einleitung	1
1.1 Definition des Amyloids	2
1.2 Mit Amyloiden assoziierte Krankheiten	3
1.3 Modelle der Amyloidbildung und Prionenreplikation	7
1.4 Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen	14
1.5 Fragestellungen und Aufbau der Arbeit	17
2. Zur Amyloidbildung von Phosphoglyceratkinase	18
2.1 Phosphoglyceratkinase (PGK)	18
2.2 Ausgangszustand	19
2.3 Endzustand	21
2.4 Amyloidbildungsreaktion	23
2.4.1 Statische und dynamische Lichtstreuung	23
2.4.2 Circular dichroismus und Infrarotspektroskopie	24
2.5 Reaktionsmechanismus	27
2.5.1 Phänomenologische Datenanalyse	27
2.5.2 Wachstumsprozess	31
2.5.3 Analyse der Konformationskonversion	36
2.6 Verallgemeinertes Diffusions-Kollisions-Modell	39
3. Zur Fehlfaltung des Prion-Proteins	43
3.1 Das Prion-Protein des Syrischen Hamsters	43
3.2 Ausgangszustand	45
3.3 Fehlfaltungsreaktion	47
3.3.1 Kinetik	48
3.3.2 Endzustände	53
3.4 Reaktionsmechanismus	54
3.4.1 Sekundärstrukturkonversion	55
3.4.2 Aggregationsprozess	56

3.5	Diskussion	61
4.	Zur Amyloidbildung von Barstar	63
4.1	Barstar	63
4.2	A-Zustand von Barstar	65
4.2.1	Einfluss der Ionenstärke auf den A-Zustand	65
4.2.2	Einfluss der Temperatur auf den A-Zustand in Abwesenheit von Salz	67
4.3	Amorphes Wachstum des A-Zustandes	68
4.4	Amyloidbildung des A-Zustandes	71
4.4.1	Übergang A-Zustand zur Typ-I-Fibrille	73
4.4.2	Übergänge zur Typ-II-Fibrille	77
4.5	Diskussion	81
5.	Diskussion	84
5.1	Vergleich	84
5.2	Kritische Oligomere	89
5.3	Hierarchische Strukturbildung des Amyloids	90
5.4	Zusammenfassung und Ausblick	92
A.	Lichtstreuung (LS)	94
A.1	Statische Lichtstreuung (SLS)	96
A.2	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	100
B.	Spektroskopische Methoden	104
B.1	Circulardichroismus	105
B.2	FTIR-Spektroskopie	106
C.	Reaktionen in Lösungen	111
C.1	Kollisionstheorie in Lösungen	112
C.2	Smoluchowski-Koagulationstheorie	114
C.3	Sequentielle Monomeraddition	117
C.4	Verfeinerte Koagulationstheorien	118
C.5	Zum Diffusions-Kollisions-Modell der Proteinfaltung	120
D.	Faktoranalyse	122
D.1	Problemstellung und Ziel der Faktoranalyse	122
D.2	Mathematische Werkzeuge	123
D.3	Beispiel mit simulierten Daten	125
D.4	Auswertung experimenteller Daten	128
D.4.1	Kriterien zur Bestimmung der Anzahl an Faktoren	128
D.4.2	Transformation des Beispiels	134
D.4.3	Probleme bei der Bestimmung der Faktoren	135
E.	Komplexe Reaktionen	136

Literaturverzeichnis	141
F. Danksagung	159
G. Curriculum Vitae	161

Abstract

This thesis deals with the kinetics of misfolding and aggregation of proteins. The kinetics of amyloid formation and precursors of three proteins, phosphoglycerate kinase (PGK), a barstar variante and the Syrian hamster Prion protein (SHaPrP(90-232)) were investigated by the use of dynamic and static light scattering, infrared spectroscopy, circular dichroism, electron microscopy and in part by analytical chromatography. The kinetics were described with concepts from the theory of colloidal aggregation and chemical kinetics.

The modelling of the kinetics starting from the monomeric PGK at pH 2 and 190 mM NaCl points to a two stage reaction cascade built up by irreversible, bimolecular elementary reaction steps. During the first stage a narrow distributed ensemble of oligomeric states with an average mass of ten monomers and essentially ordered amounts of β -sheet structure is built up. Protofibrils are formed by coalescence of the structural polar oligomers provided by the first stage which are termed critical oligomers. The found coupling between growth and acquisition of β -sheet structure is interpreted in terms of a generalized diffusion-collision model, where stabilization takes place by intermolecular interactions.

The misfolding and aggregation of SHaPrP(90-232) shows an apparent two-state transition between the initial monomeric, α -helical state and an β -sheet rich, annular octamer with high reaction order (> 2.5) at pH 4.2 and 1 M GuHCl with appropriate amounts of salt added. Progress curves monitoring the secondary structure transition can be fitted by the time-course of bimolecular reactions. The octamer forms multimers at high protein concentrations. Formation of protofibrils sets up on very long time-scales. The critical octamer is a precursor for all subsequent growth processes.

The non-native, partially folded state of barstar at low pH (A-state) can be converted in a two-stage process first to protofibrils and then to mature amyloid fibrils under appropriate environmental conditions. Conversion of the oligomeric A-state (average mass of 16 monomers) can be activated by elevated temperatures ($T \geq 50^\circ\text{C}$) in the presence of moderate amounts of salt ($[NaCl] > 0$). Formation of protofibrils is independent of protein concentration. Amorphous aggregates are formed at room temperature with sufficient amounts of salt added. In contrast elevated temperatures in absence of salt lead to dissociation of the oligomeric A-state.

All three proteins have to populate an oligomeric, partially folded state to form protofibrils and eventually mature fibrils. These critical oligomers are long-lived intermediates which are the pivotal point from which all other structures arise.

Formation of amyloid fibrils is a hierarchical assembly process where structures are built up by several stages. Models known from the literature, in particular nucleation polymerization and nucleated conformational conversion, only master partial aspects of amyloid

formation. The wide-spread assumption of a universal kinetics of amyloid formation turns out to be unjustified. In contrast, the states of critical oligomer and protofibril seem to be generic parts of the hierarchical assembly process. Comparison of the kinetics of each hierarchical level among the three investigated proteins shows no considerable similarities.

Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der Kinetik der Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen. Anhand dreier Beispiele, der Phosphoglyceratkinase (PGK) aus Hefe, einer Variante von Barstar und des Prion-Proteins des Syrischen Hamsters (SHaPrP(90-232)) wurde insbesondere die Kinetik der Bildung von Amyloidfibrillen und deren kinetischer Vorläuferstrukturen mittels dynamischer und statischer Lichtstreuung, Circular dichroismus, Infrarotspektroskopie, Elektronenmikroskopie und teilweise analytischer Chromatographie untersucht. Die Kinetiken wurden mit Konzepten der Aggregationstheorie von Kolloiden und der chemischen Kinetik beschrieben.

Die Modellierung der Kinetiken weist ausgehend von der monomeren PGK bei pH 2 und 190 mM NaCl auf eine zweistufige Reaktionskaskade, bestehend aus irreversiblen, bimolekularen Elementarschritten hin. Während der ersten Stufe wird ein engverteiltes Ensemble von Oligomeren mit einer mittleren Masse von 10 Monomeren und wesentlichen Anteilen an β -Faltblattstrukturen gebildet. Die Protofibrillen entstehen durch die Vereinigung der strukturell polaren Oligomere, die durch die erste Reaktionsstufe bereitgestellt werden und als kritische Oligomere bezeichnet werden. Die gefundene Kopplung des Wachstums der intermediären Zustände und die Zunahme der β -Faltblattstruktur kann innerhalb eines verallgemeinerten Diffusions-Kollisions-Modells interpretiert werden, bei dem die β -Stränge durch intermolekulare Wechselwirkungen stabilisiert werden.

Die Fehlfaltung und Aggregation des SHaPrP(90-232) bei pH 4.2 und 1 M GuHCl und geeigneten Zusätzen an Salz zeigt einen augenscheinlichen Zweizustandsübergang mit hoher Reaktionsordnung (> 2.5) zwischen dem monomeren, α -helikalen Ausgangszustand und einem β -faltblattreichen, ringförmigen Oktamer. Die Progresskurven der Umwandlung der Sekundärstruktur lassen sich mit dem Zeitverlauf einer bimolekularen Reaktion anpassen. Das Oktamer bildet bei hohen eingesetzten Proteinkonzentrationen Multimere. Auf sehr langen Zeitskalen setzt die Bildung von Protofibrillen ein. Das kritische Oktamer stellt die Vorstufe der nachgeschalteten Wachstumsphänomene dar.

Unter geeigneten Umgebungsbedingungen kann der nicht-nativ, partiell gefaltete Zustand von Barstar bei niedrigem pH (A-Zustand) in einem zweistufigen Prozess erst in Protofibrillen und anschließend in reife Amyloidfibrillen konvertiert werden. Zur Aktivierung der Konversion des oligomeren A-Zustandes (mittlere Masse von 16 Monomeren) sind moderate Ionenstärken ($[NaCl] > 0$) und erhöhte Temperaturen ($T \geq 50^\circ\text{C}$) notwendig. Die Bildung der Protofibrillen ist unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration. Bei Raumtemperatur und entsprechender Ionenstärke bilden sich amorphe Aggregate. Dagegen führt die Erhöhung der Temperatur in Abwesenheit von Salz zur Dissoziation des oligomeren A-Zustandes.

Alle drei Proteine müssen zur Ausbildung protofibrillärer Strukturen und gegebenenfalls reifer Fibrillen oligomere Zustände mit partiell gefalteter Konformation einnehmen. Diese kritischen Oligomere sind langlebige Intermediate, die den Dreh- und Angelpunkt für die Bildung nachgeordneter Strukturen darstellen.

Die Bildung von Amyloidfibrillen ist somit ein mehrstufiger hierarchischer Strukturbildungsprozess. Die in der Literatur bekannten Modelle der nukleierten Polymerisierung und der nukleierten Konformationskonversion werden dem höchstens in gewissen Teilaspekten gerecht. Die Annahme einer universellen Kinetik der Amyloidbildung kann im Lichte der Ergebnisse dieser Arbeit nicht aufrechterhalten werden. Dagegen scheinen die Zustände des kritischen Oligomers und der Protofibrille als Hierarchiestufen der Amyloidbildung generische Bestandteile des Prozesses zu sein. Die Kinetik der Bildung der verschiedenen Hierarchiestufen weist keine nennenswerten Gemeinsamkeiten zwischen den drei untersuchten Proteinen auf.

Abkürzungen, Symbole und Notation

Abkürzungen

AD	Alzheimer-Krankheit
ADP	Adenosin 5'-Diphosphat
AKF	Autokorrelationsfunktion
ALS	amyotrophe laterale Sklerose
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
CD	Circulardichroismus
DLCA	diffusionslimitierte Clusteraggregation
DLS	dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FT	Fourier-Transformation
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid
HD	Huntington-Krankheit/Chorea Huntington
IE	eingebetteter Fehler
IR	Infrarot
LS	Lichtstreuung
NaCl	Natriumchlorid
NKK	nukleierte Konformationskonversion
NP	nukleierte Polymerisierung
PCA	Hauptkomponentenanalyse/Principal component analysis
Prion	p roteinaceous i nfectious particle, wobei die genaue Abkürzung Proin zugunsten der leichteren Sprechweise in Prion geändert wurde
PD	Parkinson-Krankheit
PGK	Phosphoglyceratkinase
PrP	Prion-Protein
PrP ^C	zelluläre Form des Prion-Proteins
PrP ^{Sc}	infektiöse Form des Prion-Proteins
RE	Messfehler
RESO	R atio of E igenvalues calculated by S moothed and O rdinary PCA

RLCA	reaktionslimitierte Clusteraggregation
RNA	Ribonukleinsäure
SEC	Größenausschlußchromatographie
SHaPrP	Prion-Protein des Syrischen Hamsters
SLS	statische Lichtstreuung
SW	Singulärwert
SWZ	Singulärwertzerlegung
TA	Template Assembly
TCA	Trichloracetat
TSE	transmissible spongiforme Enzephalopathien
UV	ultraviolett
VIS	spektraler Breich des sichtbaren Lichts
XE	extrahierter Fehler
ZNS	zentrales Nervensystem

Symbole

A	Absorption
\bar{A}_2	erster Koeffizient der Virialentwicklung des Diffusionskoeffizienten
A_2	erster Koeffizient der Virialentwicklung des osmotischen Druckes
α	Klebewahrscheinlichkeit
c	Konzentration in g/l
d	abhängig vom Kontext entweder Durchmesser oder Dimension
D	Diffusionskoeffizient
D_0	extrapolierter Diffusionskoeffizient
ϵ	Extinktionskoeffizient
η	Viskosität
I	abhängig vom Kontext entweder Intermediat oder Intensität
k	abhängig vom Kontext entweder Ratenkonstante oder Wellenzahl
$k_{i,j}$	Ratenkonstanten bzw. Kernfunktion in der Smoluchowski-Gleichung
k_B	Boltzmann-Konstante
k_S	Smoluchowski-Ratenkonstante
l	Küvettenlänge/Schichtdicke
L	Länge
λ	Wellenlänge oder Homogenitätsexponent
μ	reduzierte Masse
M	Molmasse

M_{rel}	normierte Molmasse
ν	Frequenz
n	Reaktionsordnung
N	nativer Zustand
N_A	Avogadro-Konstante/Loschmidt-Zahl
n_1	molare Monomerkonzentration
Π	osmotischer Druck
R_G	Gyrationsradius/Trägheitsradius
R_{rel}	normierter Stokesradius
R_S	Stokes-Radius
θ	Elliptizität
τ	Zeitkonstante
t	Zeit
T	abhängig vom Kontext entweder absolute Temperatur oder Trans- mission
t_c	Koagulationszeit
U_A	säureentfalteter Zustand
z	dynamischer Skalenexponent

Notation

\dot{a}	Ableitung der Größe a nach der Zeit t
\mathbf{A}^T	Transposition
\mathbf{A}^{-1}	Inversion
$tr(\mathbf{A})$	Spur
$det(\mathbf{A})$	Determinante
$[X]$	Konzentration der Substanz X

1. Einleitung

In Deutschland und in weiten Teilen der europäischen Union ist gegenwärtig eine heftige Debatte über die sozialen Sicherungssysteme und deren zukünftige Finanzierbarkeit entbrannt. Darüberhinaus verhandelt derzeit (Sommer 2003) die Regierung Deutschlands mit der Opposition über eine Reform des Gesundheitssystems, um die Beitragssätze nicht explodieren zu lassen. Eine primäre Ursache der entstandenen Finanzierungslücken, die sich in absehbarer Zeit noch wesentlich verschärfen könnten, stellt die demographische Entwicklung der Altersstruktur dar. Seit Ende des zweiten Weltkrieges ist die durchschnittliche Lebenserwartung der Bevölkerung von ungefähr fünfundsechzig Jahren auf knapp achtzig Jahre angestiegen, und es ist kein Ende dieses Trends abzusehen. Prognosen gehen im Jahre 2050 davon aus, dass die Hälfte der Bevölkerung Deutschlands von der Altersgruppe der über 50-Jährigen gestellt wird [Pöttsch and Sommer, 2003]. Es liegt auf der Hand, dass mit der zunehmenden Überalterung der Bevölkerung, die von der Volkswirtschaft aufzuwendenden Ressourcen für die Pflegeversicherung und das Gesundheitssystem ansteigen werden, wenn der derzeitige medizinische Standard gehalten werden soll und keine entscheidenden Durchbrüche auf therapeutischen Gebieten erzielt werden.

Aus medizinischer Sicht stehen die mit zunehmendem Alter aufzubringenden finanziellen Aufwendungen u.a. im Zusammenhang mit einer Entdeckung, die Rudolf Virchow Mitte des neunzehnten Jahrhunderts machte. Er entdeckte eine makroskopische Gewebeabnormalität in Gehirnen verstorbener Patienten. Virchow folgerte aufgrund seines Charakterisierungsverfahrens, dass die der makroskopischen Erscheinung des Gehirngewebes zugrundeliegende Substanz Cellulose sei. Daher führte er für sie im Jahre 1854 den Begriff Amyloid ein, der vom Lateinischen *amylum* für Stärke abgeleitet ist [Virchow, 1854]. Zu dieser Zeit war der Unterschied von Stärke und Cellulose, der in Beziehung mit der Aufteilung in das Tierreich und die Pflanzenwelt steht, unbekannt. Diese Vorstellung wurde von Kekule und Friedreich einige Jahre später revidiert, die bewiesen, dass Proteine im Amyloid enthalten sind [Sipe and Cohen, 2000].

Im Jahre 1906 beschrieb der bayrische Psychiater Alois Alzheimer auf einem Treffen in München das klinischpathologische Syndrom seiner Patientin Auguste D., die Anfang fünfzig war. Ihr Leiden wurde später nach ihm benannt, die Alzheimer-Krankheit. Auguste D. wies die kardinalen Symptome auf, die auch heute bei den meisten Patienten beobachtet werden: fortschreitender Gedächtnisverlust, gestörte kognitive Funktionen, verändertes Verhalten einschließlich Paranoia, Wahnvorstellungen, Verlust angemessenen sozialen Verhaltens und fortschreitende Abnahme der Sprachfunktion. Während der frühen und mittleren Phasen dieses langsamen, unerbittlichen Prozesses bleibt die Aufnahmefähigkeit des Patienten erhalten. Die motorischen und sensorischen Fähigkeiten sind intakt.

Mit zunehmendem Verlust der kognitiven Fähigkeiten verlangsamten sich die motorischen Funktionen wie z.B. die Gangart. Die Abnahme der Koordination führt zu einem Erscheinungsbild, das extrapyramidalen motorischen Störungen wie bei der Parkinson-Krankheit ähnelt [Selkoe, 2001]. Die Patienten vollführen unkontrollierte, spontane Zuckungen mit den Extremitäten.

Es dauerte bis zu den sechziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts bis ein Zusammenhang des Amyloids mit der neurodegenerativen Alzheimer-Krankheit hergestellt wurde [Selkoe, 2001]. Das Aufkommen der Elektronenmikroskopie erlaubte histopathologisch die auftretenden ultrastrukturellen Änderungen im Gehirngewebe, die sogenannten senilen Plaques und die neurofibrillären „Tangles“, zu identifizieren und rückte damit das Amyloid ins Zentrum des wissenschaftlichen Interesses [Selkoe, 2001]. Beide Ablagerungen bestehen aus fibrillären Proteinaggregaten, die im Zuge der Amyloid-Kaskaden-Hypothese als Ursache der Krankheit angesehen werden [Hardy and Higgins, 1989].

Bei sechzigjährigen Menschen kommt die Alzheimer-Krankheit mit der Häufigkeit eines Falles unter zehntausend gleichaltrigen Menschen vor. Diese Quote steigt mit zunehmendem Alter dramatisch an. In der Gruppe der Menschen, die fünfundachtzig Jahre und älter sind, ist mehr als jeder dritte von der Alzheimer-Krankheit betroffen. Die jährlichen Kosten in Verbindung mit der Alzheimer-Krankheit werden in den Vereinigten Staaten von Amerika auf ungefähr zweihundert Milliarden US-Dollar geschätzt [Prusiner, 2001b].

Amyloidablagerungen treten nicht nur bei der Alzheimer-Krankheit auf, sondern kommen bei vielen weiteren neurodegenerativen Krankheiten und den sogenannten Amyloidosen vor. Einen Überblick der verschiedenen Krankheiten gibt Tabelle 1.1. In den meisten Fällen wird im Amyloid ebenfalls eine kausale Rolle bei der Pathogenese der Krankheit vermutet. Eine genaue Definition des Begriffs Amyloid scheint aber unerlässlich, bevor die Diskussion der assoziierten Krankheiten fortgesetzt werden kann.

1.1 Definition des Amyloids

Die Ultrastruktur, d.h. die Substruktur unter der Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops, der Amyloidablagerungen bilden fibrilläre Proteinaggregate, die sogenannte Amyloidfibrille. Frühe Untersuchungen des Amyloids förderten unabhängig von der beteiligten Krankheit, der genauen Quelle der Fibrillen und des konstituierenden Proteins gemeinsame Merkmale zu Tage. Gegenwärtig werden diese gemeinsamen Charakteristika im Sinne einer operationalen Definition zur Festlegung des Begriffs Amyloid verwendet [Saeger and Röcken, 1998, Sunde and Blake, 1998]:

1. Die molekulare Struktur des Amyloids ist derart, dass die Fibrille den Farbstoff Kongo Rot bindet. Die Farbstoffmoleküle des Kongo Rots wechselwirken in räumlich geordneter Weise in einer ähnlichen physikochemischen Umgebung mit der Fibrille, so dass eine charakteristische und diagnostische grüne Doppelbrechung im Polarisationsmikroskop nachweisbar ist.

2. Das Amyloid besitzt eine fibrilläre Ultrastuktur. Der Durchmesser der Fibrillen beträgt etwa 10 nm. Die Länge der Fibrillen variiert. Die Fibrillen haben ein einheitliches Erscheinungsbild. Es treten keine Verzweigungspunkte auf.
3. Röntgenbeugung an Amyloidfibrillen führt zu Beugungsbildern, die zeigen, dass die geordnete, periodische molekulare Struktur der Fibrille aus Polypeptidketten in einer ausgedehnten β -Konformation besteht. Die β -Stränge sind über Wasserstoffbrücken in Richtung der Fibrillenachse miteinander verbunden. Die β -Stränge verlaufen senkrecht zur Fibrillenachse. Sie nehmen eine Kreuz- β -Konformation ein, die sich durch einen periodischen Abstand von ungefähr 4.7 Å zwischen den Strängen auszeichnet.

Das Gesamtbild der Röntgenbeugungsmuster legt darüberhinaus eine hochgeordnete, definierte Kernstruktur aller Amyloidfibrillen nahe. Folglich sollten nur außerhalb dieses räumlichen Bereiches polymorphe Unterschiede zwischen Fibrillen von verschiedenen Proteinen existieren [Sunde and Blake, 1998]. Allerdings widersprechen sich die hochaufgelösten Strukturmodelle, die zum Aufbau der Amyloidfibrille in den letzten Jahren vorgeschlagen wurden, in einigen wesentlichen Punkten [Rochet and Lansbury, 2000]. Gegenwärtig wird eine Anordnung der β -Stränge in einer Helix favorisiert [Perutz et al., 2002, Wille et al., 2002]. Diese β -Helix windet sich um einen mit Wasser gefüllten, sonst hohlen Kern. Zwanzig Aminosäurereste bilden eine helikale Windung [Perutz et al., 2002]. Im Augenblick scheint aber eine endgültige Aussage zur genauen Amyloidstruktur verfrüht.

1.2 Mit Amyloiden assoziierte Krankheiten

Neben der eingangs erwähnten Alzheimer-Krankheit (AD) sind die Parkinson-Krankheit (PD), die Huntington-Krankheit (HD) und die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE) (auch Prionenerkrankungen genannt) die bekanntesten neurodegenerativen Krankheiten (vgl. Tab. 1.1). Bei keiner dieser neurodegenerativen Krankheiten sind Therapien bekannt, die zu einer Heilung der betroffenen Patienten führen. Nur bei PD existieren therapeutische Ansätze, die zu einer Verzögerung der Pathogenese und zu Erleichterungen für den Patienten beitragen. Vereinfachend zusammengefasst wird die Ursache der neurodegenerativen Krankheiten in einer zytotoxischen Wirkung der Amyloidfibrillen, die zur Apoptose von Nervenzellen und damit zur Zerstörung des Gewebes führt, vermutet. Alle neurodegenerativen Krankheiten können in sporadischen Formen auftreten, die mit zunehmendem Lebensalter immer wahrscheinlicher werden. Für jede dieser Krankheiten ist mindestens ein Protein bekannt, das die zugehörigen Amyloidfibrillen bildet. Bei AD sind z.B. mehrere amyloigene Proteine beschrieben, wobei das $A\beta(1-42)$ -Peptid die Hauptkomponente der senilen Plaques bildet. Ihm wird auch die auslösende Rolle bei der ganzen Ereigniskaskade zugeschrieben, die während der Pathogenese auftritt. Die neurofibrillären „Tangles“ werden dagegen vom Tau-Protein gebildet und als Folgeerscheinung vermutet [Selkoe, 2002]. Darüberhinaus sind für die meisten Proteine in Tab. 1.1 Mutationen beschrieben, die mit einer deutlich erhöhten Wahrscheinlichkeit der Erkrankung einhergehen und die jeweils erbliche Form der jeweiligen Krankheit begründen.

Proteine, die mit Amyloidablagerungen beim Menschen assoziiert sind	Zugeordnetes Krankheitsbild/ klinisches Syndrom
	<i>Neurodegenerative Krankheiten:</i>
A β	AD
α -synuclein	PD
ABri	Familiäre Britische Demenz
Lithostathine	AD
Neurofilament	Amyotrophe laterale Sklerose (ALS)
Poly-Q von Huntingtin, Androgen-rezeptor, Atrophin-1, Ataxin	Chorea Huntington (Veitstanz) , Morbus Kennedy, Haw-River-Syndrom, Spinozerebrale Ataxie
Prion protein	TSE
SOD1 mutant protein	Familiäre amyotrophe Sklerose
Tau protein	AD, PD, ALS, Tauopathien
	<i>Amyloidosen:</i>
Apolipoprotein AI	Familiäre Amyloidose
Atrial natriuretic factor	Lokales Vorhofamyloid
β_2 -microglobulin	Hämodialyse-assoziierte Amyloidose
Bence-Jones proteins κ I,III	Systemische Amyloidose
Calcitonin	Medulläres Schilddrüsenkarzinom
Cystatin C	Hereditäre zerebrale Amyloidose
Fibrinogen α -chain	Fibrinogen α -chain Amyloidose
Gelsolin	Familiäre Finnische Amyloidose
Ig light/heavy chains	Primäre systemische Amyloidose
Insulin	Lokale Inselamyloidose des Degu, Subakutanes A. bei Insulin-pflichtigen Diabetikern
Islet-amyloid polypeptide	Diabetes II
Lactoferrin	Familiäre subepithelial corneal Amyloidose
Lysozyme	Hereditäre systemische Amyloidose
Medin	Amyloid in der Aorta
Prolactin	Amyloid in Hypophysenadenomen
Serum Amyloid A	Sekundäre systemische Amyloidose, Familiäres Mittelmeerfieber, Muckle-Wells Syndrom
Transthyretin	Senile kardiovaskuläre Amyloidose Familiäre Amyloid Polyneuropathie

Tabelle 1.1: Humane amyloigene Proteine und zugeordnete klinische Syndrome bzw. Krankheitsbilder. Quellen: [Prusiner, 2001b, Saeger and Röcken, 1998, Dobson, 2001, Pepys, 2001, Temussi et al., 2003]

Die Prionenkrankheiten weisen noch eine zusätzliche Besonderheit auf. Sie sind als einzige neurodegenerative und mit Amyloiden assoziierte Krankheit innerhalb einer Spezies und unter Umständen zwischen verschiedenen Spezies übertragbar. Gerade die letzte Tatsache dürfte der breiten Öffentlichkeit im Zusammenhang mit dem Rinderwahnsinn (BSE) und der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) beim Menschen in Erinnerung sein. Vermutlich wurde die Träberkrankheit von Schafen (Scrapie) durch die Verfütterung kontaminierten Tiermehls auf Rinder und dann weiter durch den Verzehr verseuchten Rindfleischs auf den Menschen übertragen [Prusiner, 1997]. Ein Überblick der Prionenkrankheiten bei Mensch und Tier und deren Übertragungswege ist durch Tabelle 1.2 gegeben. Bei Versuchen das Wesen des Erregers bzw. des infektiösen Agens von Scrapie näher einzugrenzen, kam schon Mitte der sechziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts die Vermutung auf, dass es sich nicht um einen Virus im herkömmlichen Sinne handeln könnte [Alper et al., 1967]. Durch Bestrahlung des Erregers mit ionisierender Strahlung konnte keine vergleichbare Inaktivierung des Erregers erzielt werden, die bei Viren, die Träger von Erbinformation in Form von DNA oder RNA sind, zu erwarten wäre. Im Jahre 1982 stellte Stanley Prusiner die Hypothese auf, dass das infektiöse Agens von Scrapie aus nichts anderem als Protein bestünde und nannte es Prion (vom Englischen **proteinaceous infectious particle**, wobei die genaue Abkürzung Proin zugunsten der leichteren Sprechweise in Prion geändert wurde) [Prusiner, 1982]. Die Forschung der folgenden Jahre ergab, dass der wesentliche Bestandteil des Prionagens ein körpereigenes Protein bildet, das Prion-Protein (PrP) getauft wurde [Prusiner, 2001a]. Die Funktion des zellulären Prion-Proteins PrP^C ist bis heute unbekannt. In der infektiösen Form weist es eine fehlgefaltete Konformation auf, die PrP^{Sc} (*Sc* für Scrapie im Gegensatz zu *C* für zellulär) genannt wird. Die Existenz dieser beiden Isoformen des Prion-Proteins ermöglicht ein gewisses Verständnis des Infektionsmechanismus. Es wird vermutet, dass das PrP^{Sc} dem PrP^C bei einer Infektion seine eigene Konformation aufzwingt, so dass eine Replikation des Erregers stattfindet [Griffith, 1967, Prusiner, 1991]. Diese als Nur-Eiweiß- oder Prionen-Hypothese bezeichnete Vermutung wird durch Versuche an gentechnisch veränderten Mäusen gestützt. Die Gruppe von Charles Weissmann am Unispital Zürich zeigte Anfang der neunziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts in mehreren Studien, dass Mäuse, die kein PrP exprimieren, im Gegensatz zu Mäusen mit intaktem PrP-Gen nicht mit PrP^{Sc} infiziert werden können und nicht erkranken [Weissmann et al., 2001]. PrP^{Sc} wird heute als Sammelbezeichnung für Prion-Proteine aller Scrapie-ähnlichen Krankheiten bei Mensch und Tier verwendet. Die Krankheiten selbst werden unter transmissiblen spongiformen Enzephalopathien aufgrund des schwammartigen Erscheinungsbildes des pathologisch veränderten Gehirngewebes oder Prionenkrankheiten subsumiert (vgl. Tabelle 1.2). Stanley Prusiner wurde 1997 mit der Verleihung des Nobelpreises für Medizin für seine Verdienste um die Erforschung der Prionenkrankheiten geehrt. Der zwingende Beweis der Prionen-Hypothese steht allerdings noch aus. Bisher ist es keiner Arbeitsgruppe gelungen in vitro rekombinantes PrP^C in PrP^{Sc} umzufalten bzw. zu konvertieren.

Die Amyloidablagerungen bei den neurodegenerativen Krankheiten sind im Wesentlichen auf das Gehirn und das zentrale Nervensystem (ZNS) beschränkt, während bei den Amyloidosen dort keine Ablagerungen auftreten [Pepys, 2001]. Es wird zwischen lokalen,

1 Einleitung

Krankheit	Abkürzung	Wirt	Pathogenese
Kuru	Kuru	Mensch	ritueller Kannibalismus
Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vier Formen): iatrogene	CJD: iCJD	Mensch:	kontaminiertes Operations- material
familiäre	fCJD		hereditär
sporadisch	sCJD		somatische Mutation oder spontane Konversion von PrP ^C in PrP ^{Sc}
neue Variante	nCJD		erworben - vermutlich durch kontaminiertes Rindfleisch
Gerstmann-Sträussler- Schenker-Krankheit	GSS	Mensch	hereditär, Mutation im PrP-Gen
tödliche familiäre Schlaflosigkeit	FFI	Mensch	hereditär, Mutation im PrP-Gen
Traberkrankheit	Scrapie	Schaf, Ziege	Infektion in genetisch empfindlichen Schafen
Schwammartige Hirndegene- ration der Rinder und rin- derartigen Wiederkäuer	BSE	Rinder	Infektion mit kontami- niertem Futter
übertragbare Hirndegene- ration bei Nerzen	TME	Nerz	Infektion mit Prionen von Schafen und Kälbern
Chronisch zehrende Krankheit	CWD	Hirsche, Elche	unbekannt
Schwammartige Hirndegene- ration der Katzen	FSE	Katzen	Infektion mit kontami- niertem Futter

Tabelle 1.2: Überblick der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien bei Mensch und Tier [Prusiner, 2001b, Hörnlimann, 2001].

d.h. auf ein Organ limitierten Amyloidosen und systemischen Amyloidosen unterschieden (vgl. Tabelle 1.1) [Saeger and Röcken, 1998, Pepys, 2001]. Bei Letzteren können Ablagerungen im Organgewebe der Eingeweide, aller Gewebe außer dem Gehirn und an den Wände der Blutgefäße entstehen. Systemische Amyloidosen wirken sich üblicherweise begrenzend auf die Lebenszeit des Betroffenen aus. Sie zerstören die Struktur und Funktion des Gewebes und der Organe. Es können bei einzelnen Fällen massive Ablagerungen nachgewiesen werden, die ein Gesamtgewicht in der Größenordnung von Kilogramm erreichen können. Einige Amyloidosen haben nach dem Auftreten klinischer Symptome bzw. nach Diagnosestellung eine mittlere Überlebenszeit von 12-15 Monaten. Die Prognose kann jedoch bei manchen durch Hämodialyse und Nieren, Leber- und Herztransplantationen verbessert werden. Die häufigsten Ablagerungen beim Menschen bildet das Protein Medin in der Aorta und im Herzen. Davon sind etwa 97% aller Menschen über fünfzig Jahren [Saeger and Röcken, 1998] und praktisch alle über 60-jährigen betroffen [Häggqvist et al., 1999]. Dies zeigt, dass die Gefährlichkeit der Amyloide besonders bei organlimitierten Amyloidosen differenziert zu betrachten ist. Amyloidosen treten ebenfalls erblich und sporadisch mit steigendem Lebensalter wahrscheinlicher auf, so lassen sich z.B. Ablagerungen des Transthyretins bei 69% aller über 85-jährigen Verstorbenen finden [Saeger and Röcken, 1998].

1.3 Modelle der Amyloidbildung und Prionenreplikation

Die existierenden kinetischen Modelle der Amyloidbildung wurden immer auch aus dem Versuch heraus, gleichzeitig eine Erklärung der Replikation des Prionerregers zu geben, aufgestellt [Jarrett and Lansbury, 1993, Eigen, 1996, Serio et al., 2000]. Teilweise wurden sie sogar primär in Hinblick auf die Replikationsfrage der Prionen entwickelt, die Entstehung von Amyloidfibrillen ist bei diesen Modellen ein nachgeschaltetes Phänomen, dem nur sekundäre Bedeutung zugemessen wird [Griffith, 1967, Prusiner, 1991]. Der eigentliche Mechanismus der Pathogenese der Prionenkrankheiten ist in den vorgeschlagenen Modellen nicht enthalten [Eigen, 1996]. Im Folgenden werden die einzelnen Modelle mit ihren Hauptmerkmalen kurz vorgestellt.

„Template Assembly (TA)“

Kurz nach der Vermutung von Tikvah Alper, dass der Scrapie-Erreger keine Erbinformation enthalte [Alper et al., 1967], publizierte Griffith im Jahr 1967 theoretische Überlegungen, die eine Übertragung des Erregers durch ein sich autokatalytisch vermehrendes Protein zu erklären versuchten [Griffith, 1967]. Er nahm damit die Prion-Hypothese und die wesentlichen Elemente der eingangs zitierten Modelle vorweg. Damals fußten seine Annahmen allerdings auf reinen Spekulationen. Der Vorschlag, der Erreger bilde ein Template analog einem Keim, an dem das Protein (heute wissen wir, dass es das Prion-Protein ist) kondensiert und in den infektiösen Zustand übergeht, besitzt heute noch höchste Relevanz. Der Prozess entspricht der aus der Physik und den Materialwissen-

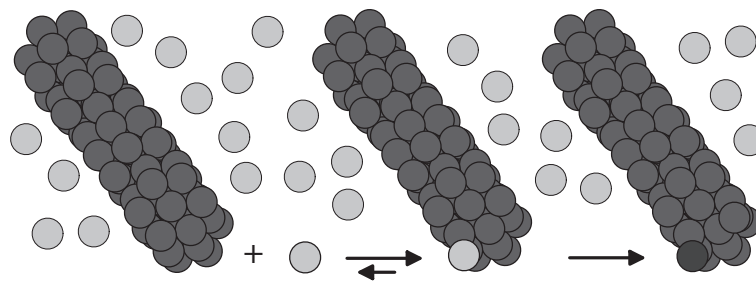


Abbildung 1.1: „Template Assembly“ (heterogene Nukleation). Die Amyloidfibrillen bzw. die „Prion-Rods“ [Riesner, 2001], die eine Kreuz- β -Struktur aufweisen, sind in Schwarz gezeichnet. Die hellen Kreise symbolisieren die Monomere, die frei in Lösung unstrukturierte oder partiell gefaltete Konformationen einnehmen.

schaften bekannten heterogenen Nukleation [Abraham, 1974]. In der Proteinchemie wird er „Template Assembly“ genannt. Das Template wird heute mit den reifen Amyloidfibrillen und speziell in Hinblick auf die Prionenkrankheiten mit den sogenannten „Prion-Rods“ [Riesner, 2001] identifiziert. In der Literatur wird zwischen reifen Amyloidfibrillen und Protofibrillen unterschieden [Rochet and Lansbury, 2000]. Letztere können Vorstufen auf dem Weg zur reifen Amyloidfibrille sein und wurden erst vor einigen Jahren entdeckt [Harper et al., 1997b, Walsh et al., 1997].

In Abb. 1.1 ist der Mechanismus des TA schematisch dargestellt. Den ersten Reaktionsschritt bildet die bimolekulare Assoziation des Monomers mit einem Fibrillenende. Dieser Schritt kann vorwiegend reversiblen oder auch irreversiblen Charakter besitzen. Das assoziierte Protein wird während des anschließenden zweiten Schrittes in die β -Struktur reiche Konformation umgefaltet, die innerhalb der Fibrille vorherrscht. Dieser Schritt stellt eine irreversible unimolekulare Reaktion dar. Er spielt bei der heterogenen Nukleation von einfachen Substanzen wie Wasser keine Rolle, weswegen der erste Schritt in diesen Fällen einen weitestgehend irreversiblen Charakter aufweist [Abraham, 1974]. TA wird also durch einen konsekutiven biunimolekularen Reaktionsmechanismus beschrieben, dessen Gleichgewicht fast vollständig auf der Seite der Produkte liegt und so effektiv irreversibel ist. Das TA wurde für das Wachstum von $A\beta$ -Fibrillen und -Plaques exakt in dieser Form *in vitro* bestätigt [Esler et al., 1996, Esler et al., 2000]. Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass Serio et al. das TA in einem Schritt, bei dem Assoziation und die Konversion der Konformation zusammenfallen, beschreiben [Serio et al., 2000]. Der Autor kann sich jedoch dieser simplifizierenden Sichtweise nicht anschließen.

Untersuchungen der Stabilität von PrP^{Sc} -Aggregaten und infektiösen Prion-Rods zeigten, dass diese als irreversibel gebildete Strukturen anzusehen sind. Nur die Behandlung mit Denaturanten wie GuHCl führt zu begrenzter Dissoziation von PrP [Callahan et al., 2001]. Durch Zugabe von PrP^{C} zu PrP^{Sc} in zellfreien Experimenten, die der Situation in Abb. 1.1 entsprechen, konnten PrP-Aggregate produziert werden, die ein wesentliches Hauptcharakteristikum von PrP^{Sc} teilen. Sie sind im Vergleich zu PrP^{C} wesentlich resistenter gegenüber

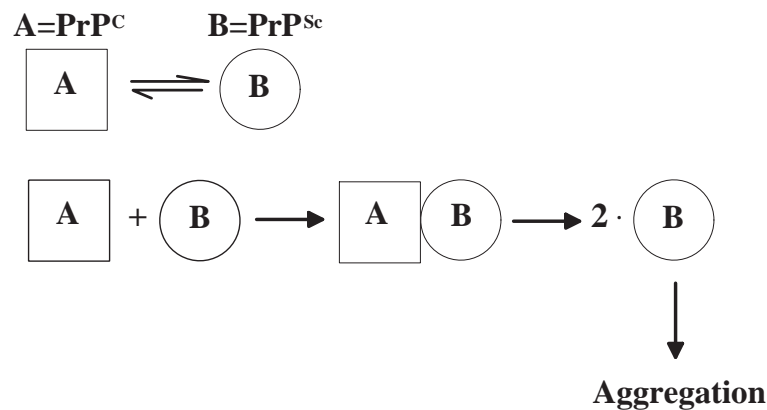


Abbildung 1.2: Autokatalytischer Heterodimer-Mechanismus gemäß Prusiner [Prusiner, 1991, Eigen, 1996]

der Verdauung mit Proteinase K. Es konnte aber keine Entstehung neuer Infektiösität belegt werden [Caughey et al., 2001].

Das TA kann das Weiterwachstum von Fibrillen erklären, aber nicht die Bildung der Fibrille selbst. Es scheidet daher zur Beschreibung der spontanen und hereditären Formen der Prionenkrankheiten und neurodegenerativen Krankheiten aus. Das Zustandekommen einer Infektion ist dagegen leicht durch die Inkorporation eines Keimes vorstellbar. Dieses Bild beinhaltet allerdings noch eine wesentliche konzeptionelle Schwierigkeit, auf die Manfred Eigen hinwies [Eigen, 1996]. Eine Infektion kann innerhalb des Organismus nur erfolgreich verlaufen, wenn immer wieder freie Enden zur Konvertierung des PrP^C in PrP^{Sc} bereitgestellt werden. Die Rolle des Maxwell'schen Dämons, der die praktisch irreversibel gebildeten Fibrillen in kleinere Stücke hackt, ist aber noch an einen unbekannten Mechanismus zu vergeben. Diese konzeptionelle Schwäche betrifft alle in diesem Unterkapitel beschriebenen Modelle außer das Prusiner-Modell. Dennoch ist hervorzuheben, dass das TA rein pragmatisch das Weiterwachstum von Amyloidfibrillen in vitro sehr erfolgreich beschreibt.

Prusiner-Modell

Prusiner postulierte den in Abb. 1.2 aufgezeichneten Mechanismus zur Erklärung der Entstehung der Infektiösität der Prionenkrankheiten [Prusiner, 1991, Eigen, 1996]. Die Bildung von Amyloidfibrillen ist ein nachgeschalteter Schritt, der unbedeutend für das Modell ist. Die zentrale Annahme ist, dass das monomere PrP in zwei Konformationen A und B existiert. Erstere stellt das PrP^C und Letztere das fehlgefaltete PrP^{Sc} dar. B kann auf A durch die Bildung eines Heterodimers seine Konformation übertragen, so dass ein neues infektiöses B-Monomer entsteht. Der Dimerkomplex zerfällt. Damit steht ein weiteres B-Monomer zur Produktion von PrP^{Sc} zur Verfügung. Es handelt sich also um eine lineare Autokatalyse, die zu exponentieller Vermehrung des Erregers führt. Die detaillier-

te mathematische Untersuchung von Manfred Eigen förderte zu Tage, dass bei Annahme realistischer Werte für die Ratenkonstanten des Prusiner-Modells, entweder immer eine Erkrankung auftritt - auch ohne vorangehende Infektion, oder es nie innerhalb der Lebenszeit von Mensch und Tier zum Ausbruch der Krankheit kommen könnte [Eigen, 1996]. Bekanntlich entspricht beides nicht den Tatsachen. Er verallgemeinerte daher das Prusiner-Modell zu einem kooperativen Modell im Sinne allosterischer Wechselwirkungen, das höhere Oligomierzustände als katalytische Zwischenschritte berücksichtigt, um die Inkonsistenzen zu beseitigen. Diese Erweiterungen führen dann auf einen Mechanismus, der phänomenologisch nicht mehr von der nukleierten Polymerisierung unterscheidbar ist [Eigen, 1996]. Die weiteren Details dieser Überlegungen werden daher ausgelassen.

Nukleierte Polymerisierung (NP)

Das Modell der nukleierten Polymerisierung ist aus der Theorie der homogenen Nukleation entlehnt, die zur Beschreibung der Kinetik von Phasenübergängen erster Ordnung entwickelt wurde [Abraham, 1974]. Sie versucht zu erklären, wie die Kondensationskeime in einer reinen Gasphase, z.B. kleine Wassertröpfchen in Wasserdampf, entstehen können. Die komplette Umwandlung in die flüssige Phase findet dann durch heterogene Nukleation an den zuvor gebildeten Keimen statt. Die homogene Nukleation gibt also eine Antwort auf die Entstehung des Template des TA. Die NP ist eine spezielle Adaption der homogenen Nukleation auf den Fall der Entstehung eindimensionaler Strukturen. Sie wurde zur Erklärung der Polymerisierung von Proteinen zu Proteinpolymeren wie dem F-Actin, der Mikrotubuli oder der Flagella entwickelt [Oosawa and Asakura, 1975]. Eine ihrer überzeugendsten Anwendungen stellt die Beschreibung der Polymerisierung des Hämoglobins von Sichelzellen dar [Eaton and Hofrichter, 1990]. Die NP wurde zur Beschreibung der Kinetik der Amyloidbildung und der Prionenreplikation direkt von Peter Lansbury übernommen [Jarrett and Lansbury, 1993]. Der Tatsache, dass in den oben angeführten Systemen die Proteinmonomere während der Aggregation ihre Sekundär- und Tertiärstruktur beibehalten, wurde nur wenig Beachtung geschenkt. Die Amyloidbildung ist ja hingegen zwingend mit der Umwandlung der Konformation der Proteinmonomere in eine vorwiegende β -Struktur verbunden. Diesem Fakt wird in begrenzter Weise durch die Annahme eines Gleichgewichts, das dem langsamen Nukleationsschritt vorgeschaltet ist, Rechnung getragen. In Abb. 1.3 ist das Gleichgewicht durch die reversible Umwandlung des Zustandes A, der im Kontext der Prionenkrankheiten dem PrP^C entspricht, und dem monomeren Zustand B, der erst zur weiteren Assoziation kompetent ist und eine prä- PrP^{Sc} -Konformation besitzt, dargestellt. Die Beschreibung der Kopplung zwischen den anschließenden Assoziationsschritten und der Konversion der Sekundärstruktur wurde nicht formuliert [Jarrett and Lansbury, 1993, Eigen, 1996], was wohl auf die Verwendung von Peptidfragmenten in den Studien, aus denen die Anwendbarkeit des NP-Mechanismus auf die Amyloidbildung gefolgert wurde, zurückzuführen ist.

Die homogene Nukleation zeichnet sich durch reversible Assoziationsschritte aus, deren Gleichgewichtslage sich fast einseitig auf der Eduktseite befindet. Die Intermediatzustände sind daher fast unbesetzt. Der Nukleus ist der thermodynamisch instabilste Zustand, der

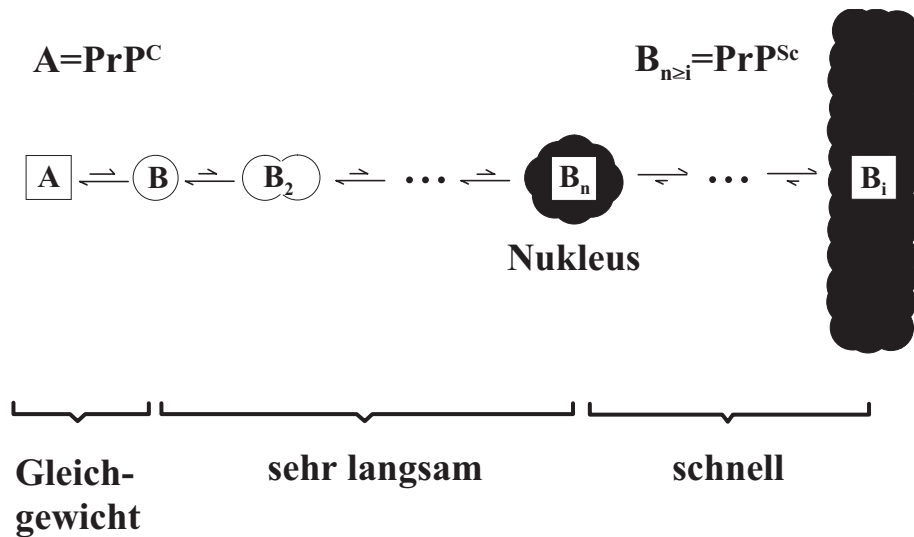


Abbildung 1.3: Nukleierte Polymerisierung [Jarrett and Lansbury, 1993, Eigen, 1996]

ein Maximum der Freien Energie entlang des Reaktionsweges einnimmt und daher am schwächsten populiert ist [Ferrone, 1999]. Die Bezeichnung Nukleus ist im rein thermodynamischen Sinne zu verstehen. Er bildet den Flaschenhals, durch den der Prozess verlaufen muss. Es handelt sich daher nicht um einen strukturellen Nukleus, der durch seine spezifische, stabile Konformation weiteres Wachstum fördert [Ferrone, 1999]. Der Nukleus wird durch Addition von B-Monomeren in bimolekularen Schritten, deren Gleichgewichtslagen quasi einseitig auf Seite der Produkte liegen, stabilisiert. Sie bewirken eine Absenkung der Freien Energie. Die späten Phasen dieses Prozesses sind im Wesentlichen äquivalent zum TA bzw. der heterogenen Nukleation. Dabei kann es eventuell natürlich zur Ausbildung struktureller Nuklei kommen, die aber vom Nukleus der ersten Phase streng unterschieden werden müssen. Die homogene Nukleationsphase ist der ratenlimitierende Schritt der Gesamtreaktion. Sie kann durch Einsäen von stabilen Keimen umgangen werden, was als passive Autokatalyse aufgefasst werden kann [Eigen, 1996]. Lansbury postulierte, dass erst der Nukleus und die aus ihm entstehenden größeren Aggregate infektiös sind. Sie sind daher innerhalb dieses Modells mit dem PrP^{Sc} identisch [Jarrett and Lansbury, 1993].

Zur Etablierung eines NP-Mechanismus werden in der Literatur immer wieder drei Kriterien angeführt [Thirumalai et al., 2003], die auf den Arbeiten von Lansbury beruhen [Jarrett and Lansbury, 1993] und in diesen als diagnostisch für einen NP-Mechanismus hingestellt werden [Rochet and Lansbury, 2000]:

1. Eine kritische Monomerkonzentration, unterhalb derer die Amyloidbildung nicht in Gang kommt. Konzentration oberhalb dieser Schwelle stellen übersättigte Lösungen analog der homogenen Nukleation von Wasserdampf dar.

2. Verzögerungszeiten („Lag“-Phasen) zu Beginn der Reaktion, in denen keine Änderungen der gemessenen Signale nachweisbar sind, wobei meist ein exponentieller Signalverlauf unterstellt wird.
3. Einsäen von vorgeformten Fibrillen löst die sofortige Polymerisierung zu Amyloidfibrillen aus, womit die Verzögerungsphase aufgehoben wird.

Der letzte Punkt hat natürlich mit einem homogenen Nukleationsschritt nichts zu tun. Er entspricht der heterogenen Nukleation. Die Keime können aber auf vielfältigen Wegen entstehen, ohne dass dazu ein homogenes Nukleationsereignis involviert sein müsste.

Zur Illustrierung des zweiten Punktes zitiere ich Ferrone: „Although protein aggregation has been studied for a quite long time, a number of fallacies persist. Probably the most notable is the assumption that a lag time in the kinetic represents a nucleation phase and that the end of such a lag corresponds to cessation of nucleation“ [Ferrone, 1999]. Jeder kinetische Prozess mit einer Zeitabhängigkeit der Signalverläufe der Form $\propto t^z$ mit $z > 1$ besitzt eine „Lag“-Phase. Ein Beispiel stellt die in Anhang C vorgestellte reaktionslimitierte Kolloidaggregation dar, die mit der homogenen Nukleation keinerlei Gemeinsamkeiten teilt.

Die Bestimmung einer kritischen Konzentration ist mit großen experimentellen Schwierigkeiten verbunden. Sie kann nicht nach Ablauf der Reaktion vorgenommen werden, da ein 100% Eduktumsatz für keinen Mechanismus zu erwarten ist und praktisch immer monomeres Protein in Lösung bleibt. In der Literatur existieren aber kaum Berichte, die eine systematische Bestimmung der kritischen Konzentration beschreiben. Ich will an einem Beispiel die möglichen Konflikte, die auftreten können, illustrieren. Wood et al. haben für das mit PD assoziierte Protein α -Synuclein einen NP-Mechanismus postuliert [Wood et al., 1999]. Die kritische Konzentration wurde nach Ablauf der Fibrillenbildung durch Abzentrifugieren der Aggregate und anschließende Messung der Konzentration zu 0.4 g/l (28 μ M) bestimmt. Hashimoto et al. berichten, dass die Fibrillenbildung bis zu einer eingesetzten Proteinkonzentration von 1.44×10^{-4} g/l (10 nM) abläuft, was etwa um Faktor 10 über ihrer Detektionsgrenze liegt [Hashimoto et al., 1998]. Aus Sicht der Polymerphysik entspricht eine derart niedrige Proteinkonzentration einer stark verdünnten Polymerlösung, die kaum etwas mit der nötigen Übersättigung bei der homogenen Nukleation gemein hat [Doi and Edwards, 1986] (Die Überlappkonzentration von α -Synuclein beträgt etwa 41 g/l (2.8 mM), wenn man für den Gyrationradius das Skalengesetz von Damaschun et al. zugrundelegt [Damaschun et al., 1998]). Im Vergleich dazu beträgt die Konzentration von Hämoglobin in Sichelzellen ca. 250-300 g/l (3.9-4.7 mM). Die kritische Konzentration wurde bei Experimenten in vitro zu 176 g/l (2.7 mM) bei 25°C bestimmt [Eaton and Hofrichter, 1990].

Kurzum, alle drei Kriterien sind weder einzeln noch gemeinsam indikativ für einen NP-Mechanismus. Genau das Gegenteil ist der Fall. Die Abwesenheit einer der drei aufgeführten Eigenschaften schließt die Anwendbarkeit eines einfachen NP-Mechanismus aus und erzwingt weitreichende Modifikationen. Tatsächlich weist nur die gleichzeitige Beobachtung einer Verzögerungszeit und einer hohen apparenten Reaktionsordnung über einen hinreichend

großen Bereich eingesetzter Proteinkonzentrationen auf einen möglichen NP-Mechanismus hin, der aber durch quantitative Studien erhärtet werden muss [Ferrone, 1999].

Basierend auf dem Konzept des NP-Mechanismus existieren von zwei unabhängigen Gruppen mehrere Arbeiten zur Amyloidbildung von A β -Peptiden [Lomakin et al., 1996, Kusumoto et al., 1998, Tanski and Murphy, 1992, Shen and Murphy, 1995, Murphy and Pallitto, 2000], die in jeweils sehr detaillierten mechanistischen Beschreibungen münden [Lomakin et al., 1997, Pallitto and Murphy, 2001]. Beide Arbeiten müssen aber den einfachen NP-Mechanismus um wesentliche Teilreaktionen erweitern, um Einklang mit den experimentellen Befunden zu erzielen. Pallitto et al. führte zusätzlich zum Wachstum durch Monomeraddition das Wachstum von Protofibrillen durch laterale sowie End-zu-End-Assoziation ein [Pallitto and Murphy, 2001], was experimentell auch von anderen Gruppen bei A β -Peptiden beobachtet wurde [Harper et al., 1997a, Walsh et al., 1997]. Lomakin et al. erweiterten den NP-Mechanismus, in dem sie eine Bildungsreaktion von Micellen hinzufügten. Dies wurde notwendig, um den unerwarteten Befund einer Proteinkonzentration, oberhalb derer die Kinetiken unabhängig von den eingesetzten Konzentrationen wurden, erklären zu können [Lomakin et al., 1997].

Nukleierte Konformationskonversion

Die nukleierte Konformationskonversion (NKK) wurde aus Studien zur Fibrillierung des NM-Konstruktes der Hefe-Priondeterminante Sup35 abgeleitet [Serio et al., 2000]. Die Hefe-Prionen sind hereditäre Elemente, die im Organismus der Hefe nicht durch DNA kodiert werden. Sie können ein Umschalten des Zellstoffwechsels zu einem anderen Zustand bewirken [Serio and Lindquist, 2001]. Sie müssen als eigenständiges Phänomen, das klar abgegrenzt von den Prionenkrankheiten und dem Prion-Protein ist, aufgefasst werden [Couzin, 2002]. Das NM-Konstrukt umfasst die N-terminale und die mittlere Region des Proteins Sup35 der Hefe, das diese Stoffwechseländerungen hervorrufen kann [Serio et al., 2000].

Die anfänglichen Phasen der Fibrillierung erwiesen sich als unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration. Während dieser Phase werden gemäß der NKK reversibel Oligomere mit einer dynamischen Quartärstruktur gebildet (vgl. Abb. 1.4) [Serio et al., 2000, Serio and Lindquist, 2001]. Diese wandeln sich in geordnete Oligomere um. Dieser Schritt stellt die nukleierte Konformationskonversion dar, dem das Modell seinen Namen verdankt. Ich zitiere aber lieber den originalen Wortlaut von Serio et al., um einer Verfälschung der Sachverhalte durch meine eigene Interpretation vorzubeugen, und dadurch dem Leser eine eigene Beurteilung zu ermöglichen: „This model, nucleated conformational conversion (Abb. 1.4), incorporates aspects of NP and TA with additional features. Conformational conversion is nucleated by a complex of A state proteins (s. Abb. 1.4) and is driven by assembly. Nuclei form by conformational rearrangements of less structured protein within the context of a structurally molten, oligomeric intermediate“ [Serio et al., 2000]. Die Nuklei beinhalten zwischen 20 und 80 Monomere [Serio et al., 2000, Xu et al., 2001]. Weiteres Wachstum findet durch Aggregation von Oligomeren, sowie durch Monomeraddition an den Oligomeren statt (Serio et al., 2000).

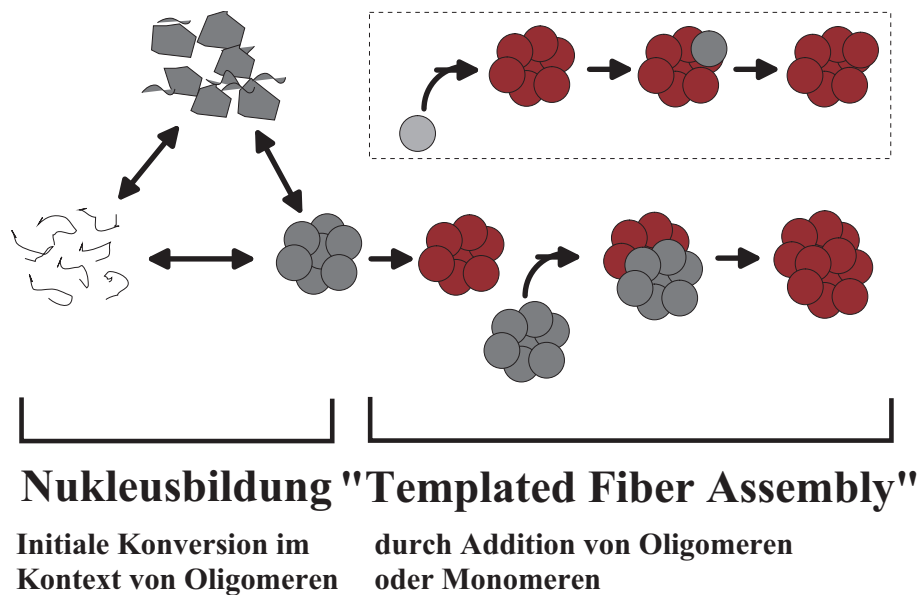


Abbildung 1.4: Nukleierte Konformationskonversion gemäß Serio et al. (NKK) [Serio et al., 2000]. Das Edukt bilden entfaltete Monomere. Die grauschattierten Assoziate stellen Oligomere dar, die über eine strukturell dynamische Konformation ähnlich einer Flüssigkeit verfügen. In Rot sind die strukturell geordneten oligomeren Zustände nach erfolgter Konversion der Konformation eingefärbt. Die roten Kreise stellen die Monomere im A-Zustand nach der Terminologie von Serio et al. dar. Das Teilbild zeigt, dass nach den Folgerungen von Serio et al. die geordneten Oligomere auch durch das TA weiterwachsen können [Serio et al., 2000, Serio and Lindquist, 2001]. Die eingefügte Beschriftung entspricht jener in [Serio and Lindquist, 2001].

Der Hauptunterschied der vorgestellten Modelle ist durch die Anordnung des Reaktionsschrittes, der die Fehlfaltung bzw. Konversion der Konformation beschreibt, in Relation zu den ablaufenden Aggregationsschritten innerhalb des jeweiligen Reaktionsmechanismus gegeben.

1.4 Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen

In den letzten Jahren wurde über die Bildung von Amyloidstrukturen von Proteinen, die nicht mit Krankheiten in Verbindung stehen, berichtet [Guijarro et al., 1998, Damaschun et al., 1999]. Tabelle 1.3 gibt einen Überblick der derzeit bekannten amyloidbildenden Proteine und Peptide. Darunter befinden sich die 26 Proteine, die in Verbindung mit Ablagerungen beim Menschen stehen (vgl. Tab. 1.1). Hinzu kommen zwei prionähnliche Proteine aus Hefen und eines von einem Pilz. Darüber hinaus wurde bei 34 weiteren Proteinen Amyloidbildung nachgewiesen. Eine Zuordnung zu Krankheiten bei diesen Proteinen ist nicht möglich. Es ist auch in Zukunft mit dem Anwachsen dieser Gruppe von Proteinen

zu rechnen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Missfaltung in Form von Amyloiden eine Eigenschaft aller Proteine ist. Es sind keinerlei gemeinsame Eigenschaften der 63 Proteine bisher erkannt worden. Die Kettenlänge reicht von ca. 20 Aminosäuren ($A\beta$ -Fragmente) bis zu 415 Aminosäuren (PGK) [Damaschun et al., 1999, Damaschun et al., 2000]. Manche Autoren gehen in ihren Spekulationen sogar soweit, dass der Amyloidzustand als absolutes Minimum der Freien Energie von Polypeptidketten angenommen wird und damit energetisch tiefer als der native Zustand liegen würde [Dobson, 2001, Thirumalai et al., 2003].

Aus Sicht der Polymerphysik treten allerdings einige konzeptionelle Schwierigkeiten auf. Es ist schon seit über sechzig Jahren bekannt, dass Homopolymere, die über regelmäßig angeordnete, identische Seitengruppen verfügen, in der Form von Fasern kristallisieren können. Dabei wird die Hauptkette auf sich selbst in einer Lamellenstruktur hin- und hergefaltet. Die parallelen Hauptkettensegmente verlaufen also senkrecht zur Ausbreitungsrichtung der Lamelle [Gedde, 1999]. Diese Struktur einfacher Polymere wie z.B. Polyethylen stellt das Analogon zur Amyloidstruktur der Polypeptide dar. Es ist nun ein zentrales Dogma der Polymerphysik, dass ataktische Heteropolymere nicht kristallisieren können [Gedde, 1999]. Ataktische Heteropolymere haben unterschiedliche Seitengruppen, die unregelmäßig entlang der Hauptkette angeordnet sind. Dies liegt daran, dass der durch die Lamellenstruktur erzeugte enthalpische Gewinn nicht den mit ihr verbundenen Verlust an Konformationsentropie kompensieren kann. Proteine und Polypeptide stellen aus Sicht der Polymerphysik ataktische Heteropolymere dar. Der Leser mag nach dem zuletzt Geschriebenen verwundert sein, dass Polypeptide überhaupt Amyloide bilden. Das liegt aber daran, dass sie zwischen den parallel verlaufenden β -Strängen Wasserstoffbrücken ausbilden [Sunde and Blake, 1998]. Besonders gut wird dies in dem Modell des „polaren Reißverschlusses“ von Max Perutz verdeutlicht [Perutz et al., 1994]. Die Bildung von Wasserstoffbrücken stellt eine zusätzliche Möglichkeit der Absenkung der enthalpischen Beiträge zur freien Energie dar, über die Polymere aus nur apolaren Gruppen nicht verfügen. Ob zu jeder beliebigen Aminosäuresequenz Umgebungsbedingungen gefunden werden können, die eine Kompensation des Verlustes an Konformationsentropie erlauben, ist daher eine offene Frage.

Unabhängig von der medizinischen Relevanz der Amyloide und den grundsätzlichen physikochemischen Fragestellungen kommt der Amyloidbildung im technologischen Bereich eine wachsende Bedeutung zu. Neueste Studien berichten über die Herstellung metallummantelter Amyloidfibrillen, denen in Zukunft eine mögliche Rolle als leitende Nanodrähte in der Elektronik zukommen könnte [Reches and Gazit, 2003, Scheibel et al., 2003].

Das generelle Studium der Aggregation von Proteinen und deren Ursachen ist seit dem Aufkommen der rekombinanten Herstellungsmethoden von Proteinen in der Biotechnologie und der pharmazeutischen Industrie von fundamentaler Bedeutung [Young et al., 1993]. Beispielsweise fallen Proteine bei der heterologen Expression in bakteriellen Organismen häufig als Aggregate in Form sogenannter Einschlusskörper an [Fink, 1998]. Die Rückgewinnung des nativen Proteins erfordert dann geeignete Rückfaltungsprotokolle. Die Auflösung der Einschlusskörper führt häufig zu intermediären Zuständen. Die Rückfaltungsreaktion dieser Zustände zum funktionellen Zustand kann in Konkurrenz mit Aggregationspro-

1	<i>ABri</i>	33	Human amylin
2	Acylphosphatase ¹	34	HypF-N-terminal domain
3	ADA2h	35	<i>Ig light/heavy chains</i>
4	Adenovirus fiber shaft peptide	36	<i>Insulin</i>
5	α/β segment (TIM)	37	<i>Islet-amyloid polypeptide</i>
6	α -helix-turn- α -helix peptide	38	<i>Lactoferrin</i>
7	α -Lactalbumin	39	<i>Lithostathine</i>
8	apo-myoglobin	40	<i>Lysozyme</i> ^{3,4}
9	α -synuclein ²	41	<i>Medin</i>
10	<i>Apolipoprotein AI</i>	42	Methionine aminopeptidase
11	Aspartat-cont. designed. pept.	43	Model "VT" peptides
12	$A\beta(1-42)$ ^{1,2}	44	Monellin
13	<i>Atrial natriuretic factor</i>	45	NAC peptide
14	B1 Ig-binding domain of protein G(β_1)	46	<i>Neurofilament</i>
15	Barstar	47	P22 tailspike β -helix domain
16	<i>Bence-Jones proteins κ I,III</i>	48	P53 tetramerization domain
17	β_2 -microglobulin ^{1,2}	49	various Poly-L-aminoacids
18	BH peptide from OspA	50	<i>Poly-Q inkl. Huntingtin</i>
19	<i>Calcitonin</i> (human)	51	Presenilins (PS1, PS2)
20	Chorion protein (silk moth)	52	<i>Prion protein</i> ^{1,2,3}
21	<i>Chrysopa flava</i> silk fibroin	53	<i>Prion-like protein Het-s</i>
22	CspA	54	<i>Prion-like protein Sup 35</i>
23	CspB ¹	55	<i>Prion-like protein Ure2</i>
24	<i>Cystatin C</i>	56	<i>Prolactin</i>
25	Cytochrome C ₅₅₂	57	Prothymosin α
26	Denovo amyloid proteins (np)	58	<i>Serum Amyloid A</i>
27	Designed Ad-2 α	59	SH3 domains
28	<i>Fibrinogen α-chain</i>	60	<i>SOD1 mutant proteins</i>
29	Fibronectin type III domain	61	<i>Tau protein</i> (+fragments)
30	<i>Gelsolin</i>	62	<i>Transthyretin</i> ^{1,2,4}
31	Herpes simpl. virus gl.prot.B	63	Yeast PGK
32	Human- α -L-iduronidase		

Tabelle 1.3: Zusammenstellung amyloigener Proteine und Peptide. Die Auflistung beruht auf dem Kenntnisstand des Autors im Frühjahr 2003. Die zugehörigen Referenzen können leicht durch die Datenbank Medline unter Angabe des Proteinnamens und des Suchwortes „Amyloid“ aufgefunden werden. Kursivdruck weist auf assoziierte Amyloidablagerungen bei lebenden Organismen hin. Die hochgestellten Indizes bedeuten, dass verschiedene, entsprechend modifizierte Primärsequenzen des jeweiligen Proteins bzw. Peptids ebenfalls Amyloidfibrillen bilden: ¹Fragmente, ²Mutanten, ³Spezien, ⁴Varianten.

zessen stehen, die als Nebenreaktionen die Ausbeute des nativen Proteins herabsetzen [Kiefhaber et al., 1991, Jaenicke and Seckler, 1997].

1.5 Fragestellungen und Aufbau der Arbeit

Gegenwärtige therapeutische Forschungsansätze stellen die Inhibierung der Amyloidbildung und die Stabilisierung des nativen Zustandes in den Vordergrund [Wanker, 2000, Soto, 2002]. Dafür kommen kleine organische Moleküle in Betracht, die spezifisch an den Fibrillen oder Vorläuferstufen binden und weiteres Wachstum unterbinden oder direkt den nativen Zustand vor der Aggregation schützen [Conway et al., 2001, Hammarström et al., 2002]. Diese Anliegen setzen natürlich ein tieferes Verständnis der Kinetik der Amyloidbildung und der dabei auftretenden Intermediate sowie der physikochemischen Bedingungen, die eine Fibrillierung begünstigen, voraus. Hierzu wurden die Amyloidbildungsreaktionen von drei Proteinen, nämlich von Phosphoglyceratkinase (PGK), Barstar und dem Prion-Protein experimenteller und theoretischer Studien unterzogen. Die ersten beiden stellen reine Modellproteine dar, die nicht mit einer Krankheit verbunden sind. Aus ihrer Untersuchung sollen, falls möglich, allgemeinere Prinzipien des Mechanismus der Amyloidbildung abgeleitet werden. Ein weiteres Anliegen dieser Arbeit ist es, die existierenden Modelle einer kritischen Überprüfung anhand der Erkenntnisse, die aus dem Studium der drei Proteine gewonnen wurden, zu unterziehen.

Die Ergebnisse der Studien an der PGK, Barstar und dem Prion-Protein sind in den Kapiteln 2, 4 und 3 niedergelegt. Die Resultate werden im Kapitel 5 verglichen. Die allgemeineren Schlussfolgerungen sind ebenfalls dort dokumentiert. Die verwendeten experimentellen Methoden sind in den Anhängen A und B beschrieben. Die Beschreibung der Kinetik der Amyloidbildung der PGK erforderte tiefergehende Konzepte, die aus der Beschreibung diffusionskontrollierter Reaktionen bekannt sind. Dieser Thematik widmet sich Anhang C. Die Auswertung der spektroskopischen Daten erfolgte mit faktoranalytischen Methoden, die in Anhang D vorgestellt werden. Der Anhang E zeigt anhand eines simulierten Beispiels einige Merkmale komplexer Reaktionen auf, die in Zusammenhang mit der Amyloidbildung des Prion-Proteins in Kapitel 3 stehen.

2. Zur Amyloidbildung von Phosphoglyceratkinase

Die Entdeckung von amyloidbildenden Proteinen, die nicht mit der Pathogenese einer bekannten Krankheit verknüpft sind, eröffnete die Möglichkeit, an teilweise sehr gut charakterisierbaren Systemen generelle Einsichten zur Bildung dieser Strukturen zu gewinnen. Die Phosphoglyceratkinase stellt gegenwärtig das größte Protein in dieser Klasse von Proteinen dar [Damaschun et al., 2000] und wird im ersten Abschnitt dieses Kapitels näher vorgestellt. Anschliessend wird der Ausgangszustand der PGK, der das Edukt der Amyloidbildungsreaktion darstellt, beschrieben. Der Morphologie der entstehenden Protofibrillen ist der darauffolgende Abschnitt gewidmet. In den weiter nachfolgenden Abschnitten wird die Bildungsreaktion untersucht.

2.1 Phosphoglyceratkinase (PGK)

Das Enzym Phosphoglyceratkinase katalysiert die Energie liefernde, erste Substratkettenphosphorylierung während der zweiten Stufe der Glycolyse. Dabei wird 1,3-Biphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerat umgewandelt, und gleichzeitig die energiereiche Phosphatgruppe von der C-1 Position des 1,3-Biphosphoglycerats auf die γ -Position von ADP übertragen, wodurch ATP entsteht. Die Produkte dieser Reaktion sind also 3-Phosphoglycerat und ATP [Jaenicke, 1999].

Die PGK ist ein monomeres, einkettiges Enzym, das aus 415 Aminosäuren besteht. Die zwei Domänen des Proteins sind durch eine Scharnierregion verbunden, die zweimal von der Polypeptidkette durchlaufen wird (Abb. 2.1). Die beiden Domänen bestehen jeweils aus einem Kern von sechs parallelen Strängen aus β -Faltblättern, die von α -Helices umgeben sind, die durch β -Turns und Bereiche irregulärer Struktur mit den β -Faltblattsträngen verbunden sind. Die Polypeptidkette bildet den Hauptteil der N-terminalen Domäne aus, bevor sie die Scharnierregion kreuzt und die C-terminale Hälfte ausformt. Ein kleiner Teil der C-terminalen Aminosäuren durchquert die Verbindungsregion nochmals zurück zur N-terminalen Domäne; dadurch endet der C-Terminus in der Nähe des N-Terminus [Watson et al., 1982].

Die katalytische Aktivität des Enzyms lässt sich durch die Zweidomänenstruktur des Moleküls erklären. Nach der tertiären Komplexbildung mit den Liganden führt das monomere Protein eine ausgeprägte Scharnierbewegung aus, wodurch die Ligan-



Abbildung 2.1: Phosphoglyceratkinase: Die α -Helices sind rot und die β -Faltblätter blau eingefärbt. Die linke Domäne stellt die N-terminale Domäne dar, dementsprechend ist rechts die C-terminale Domäne zu sehen.

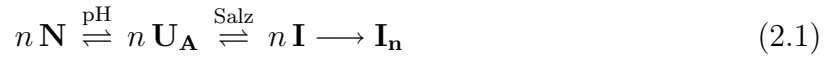
den ADP und 1,3-Biphosphoglycerat in unmittelbare Nachbarschaft gebracht werden [Banks et al., 1979, Bernstein et al., 1997, Dryden et al., 1992].

Die PGK ist ein Paradebeispiel für α/β -Proteine, das aus zwei nicht angrenzenden, ungefähr gleich großen Domänen besteht. Sie stellt daher ein Paradigma für Studien zur Proteinfaltung von Zweidomänenproteinen dar [Jaenicke, 1999].

2.2 Ausgangszustand

Die nativ gefaltete PGK, bezeichnet durch das Symbol **N** in Gl. 2.1, wird durch Absenken des pH-Wertes in saurem Milieu entfaltet. Der säureentfaltete Zustand **U_A** zeichnet sich durch ein CD-Spektrum im fernen ultravioletten Spektralbereich aus, das typisch für ein

entfaltetes Protein ist. Die komplette Abwesenheit des nahen UV-Spektrums weist auf den Zusammenbruch jeglicher tertiärer Struktur hin [Damaschun et al., 1999].



Der hydrodynamische Radius R_S (auch Stokes-Radius genannt) und der Gyrationradius R_G (auch Trägheitsradius genannt) des Zustandes \mathbf{U}_A betragen $R_S = 7.42(\pm 0.08)$ nm bzw. $\langle R_G^2 \rangle^{1/2} = 11(\pm 1)$ nm [Damaschun et al., 1999]. Beide Radien sind Maße für die Abmessungen eines Moleküls. Der hydrodynamische Radius eines Partikels entspricht dem Radius einer Kugel, die den gleichen Diffusionskoeffizienten wie das Partikel hätte. Er ist somit eine phänomenologische, aber dennoch modellunabhängige Grösse. Der Gyrationradius beschreibt die Verteilung der Masse eines Partikels um seinen Schwerpunkt. Er ist eine intrinsische Größe, die für jedes massenbehaftetes Objekt wohldefiniert ist (vgl. Anhang A).

Die entsprechenden Werte für den nativen Zustand \mathbf{N} lauten $R_S = 2.97$ nm bzw. $\langle R_G^2 \rangle^{1/2} = 2.44$ nm [Damaschun et al., 1998]. Dies demonstriert eindrucksvoll die Zunahme in den molekularen Abmessungen des säureentfalteten Zustandes, der am besten durch ein Ensemble von Konformationen beschrieben werden kann, das dem eines Zufallsknäuels mit einer Persistenzlänge von 3 nm entspricht [Damaschun et al., 1998, Damaschun et al., 1999]. Die anfängliche Entfaltungsreaktion in Gl. 2.1 ist reversibel, die PGK kann durch Anheben des pH-Wertes in den neutralen Bereich wieder in die native Konformation zurückgefaltet werden.

Die Zugabe von Salzen, wie Natriumchlorid (NaCl) oder Trichloracetat (TCA), zur säureentfalteten PGK führt zur Ausbildung von erheblicher Sekundärstruktur [Damaschun et al., 1999]. Das Molekül befindet sich in einem vornehmlich α -helikal gefalteten Zustand, was die typische Form des CD-Spektrums mit den beiden Minima bei 208 nm und 222 nm in Abb. 2.2 belegt. Ab einer kritischen Grenzkonzentration an Anionen, die für NaCl bei etwa 150 mM liegt, finden zeitabhängige Änderungen des CD-Spektrums und damit der Konformation des Moleküls statt [Damaschun et al., 1999]. Unterhalb dieser kritischen Grenze kann durch Rückdialyse unter säureentfaltenden Bedingungen der Zustand \mathbf{U}_A aus dem anioneninduzierten, partiell gefalteten Zustand \mathbf{I} zurückgewonnen werden, weshalb dieser Schritt in Gl. 2.1 als reversibel dargestellt wird. Oberhalb der kritischen Ionenkonzentration ist diese Reversibilität aufgrund der einsetzenden Amyloidbildungsreaktion nicht mehr gegeben.

Die zur Untersuchung der Amyloidbildungsreaktion verwendete Ionenkonzentration betrug 190 mM NaCl und lag damit deutlich über dem kritischen Schwellenwert von 150 mM. Es wurde die Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten und der Molmasse dieses Zustandes direkt nach Zugabe von 190 mM NaCl bestimmt (siehe Abb. 2.2). Extrapolation zu verschwindender Proteinkonzentration ergibt eine Molmasse von 48510 g/mol (Abb. 2.2), was innerhalb einer Fehlergrenze von 10% dem chemischen Wert der PGK von $M = 44570$ g/mol entspricht. Der Eduktzustand der PGK für die Amyloidbildungsreaktion kann somit als rein monomer angenommen werden. Die zugehörigen Molekülabmessungen

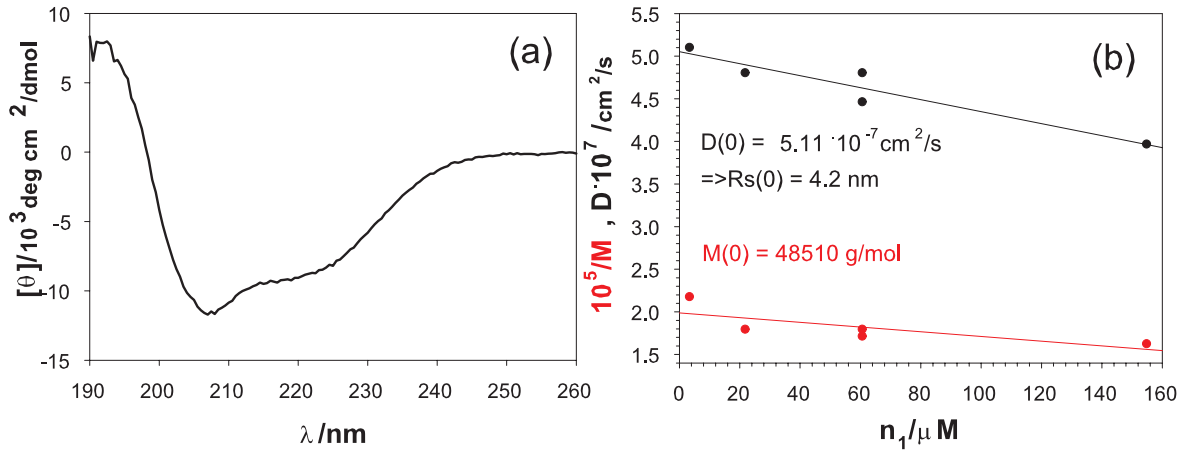


Abbildung 2.2: Eigenschaften des Zustandes **I** der PGK, der das Edukt der Amyloidbildungsreaktion ist. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. (a) CD-Spektrum, das mit den beiden Minima bei 208 nm und 222 nm typisch für α -helikale Sekundärstruktur ist. Die Proteinkonzentration betrug $n_1 = 21.8 \mu\text{M}$. (b) Konzentrationsabhängigkeiten des Diffusionskoeffizienten D und des Molekulargewichtes M . Lineare Regression der dynamischen Lichtstreuadaten ergab $D = D_0(1 + \bar{A}_2 n_1) = 5.11(1 - 7443.19 n_1) \text{ cm}^2/\text{s}$ für den Diffusionskoeffizienten. Daraus ergibt sich ein Stokes-Radius von $R_S = 4.2(\pm 0.2) \text{ nm}$. Extrapolation liefert einen Wert von $M = 48510 \text{ g/mol}$ für die Molmasse der PGK.

in Form des hydrodynamischen Radius R_S können durch lineare Regression des Diffusionskoeffizienten D und unter Anwendung der Stokes-Einstein-Gleichung

$$R_S = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad , \quad (2.2)$$

wobei k_B die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur, und η die Viskosität des Lösungsmittels bezeichnet, bestimmt werden. Der aus den in Abb.2.2 gezeigten Daten bestimmte hydrodynamische Radius beträgt $R_S = 4.2(\pm 0.2) \text{ nm}$. Dieser Wert liegt zwischen den oben aufgeführten Resultaten für den nativen Zustand **N** und den säureentfalteten Zustand **U_A**. Im Zustand **I** zu Beginn der Amyloidbildungsreaktion liegt die PGK in einer monomeren, kollabierten und weitgehend α -helikal strukturierten Form vor [Damaschun et al., 1999].

2.3 Endzustand

Die Produkte **I_n** der Amyloidbildungsreaktion gemäß des letzten Schrittes in Gl. 2.1 sind meist kurze, „wurmartige“ Fibrillen (s. Abb.2.3) [Damaschun et al., 2000]. Ihr Durchmesser d beträgt $d = 8 - 9 \text{ nm}$, die Längen L sind zwischen $L = 50 - 250 \text{ nm}$ verteilt. Sie

besitzen ein für β -Faltblattstrukturen charakteristisches CD-Spektrum, das sich durch ein ausgeprägtes Minimum bei 215 nm auszeichnet (s. Abb.2.3). Die für Amyloidfibrillen typische Kreuz- β -Struktur wurde mittels Röntgenstreuung in Lösung durch Nachweis des charakteristischen Diffraktionspeaks bei 4.7 Å bestätigt [Damaschun et al., 2000].

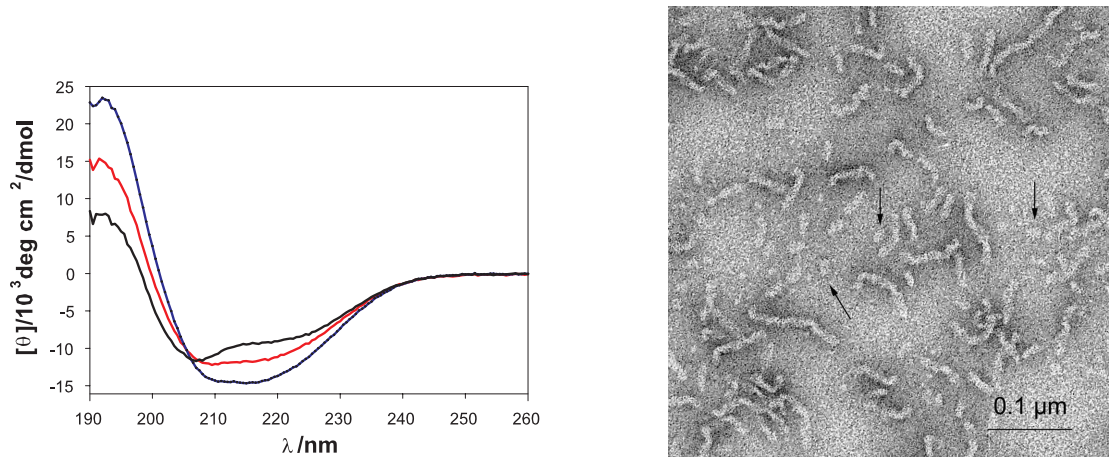


Abbildung 2.3: Eigenschaften von Zwischenprodukten und des Endproduktes $\mathbf{I_n}$ der PGK. Links ist das CD-Spektrum des Endproduktes nach 144 Stunden (blaue Linie) zu sehen. Für die elektronenmikroskopische Aufnahme auf der rechten Seite wurde die Reaktion nach 12 Stunden durch eine 1:10-fache Verdünnung der Lösung und Aufbewahrung bei $T = 4^\circ\text{C}$ verzögert. Es sind kurze Fibrillen sowie kleine Oligomere, auf die durch Pfeile gesondert hingewiesen wird, zu sehen. Das CD-Spektrum nach 14 Stunden (rote Linie) spiegelt die spektroskopische Situation, die der elektronenmikroskopischen Aufnahme entspricht, wider. Am Ende der Reaktion sind keine Oligomere mehr zu sehen (Aufnahme nicht gezeigt). Zum Vergleich ist links das Spektrum des vorwiegend α -helikalen Eduktes nochmals eingezeichnet (schwarze Linie). Die Proteinkonzentration betrug $n_1 = 21.8 \mu\text{M}$. Alle gezeigten Daten stammen aus dem gleichen Ansatz.

Luftgetrocknete Tropfen der Proteinlösung wurden mit Kongo Rot angefärbt und weisen gelbgrüne Doppelbrechung unter gekreuzten Polarisatoren im Lichtmikroskop auf [Damaschun et al., 2000]. Das positive Ergebnis dieses klassischen Amyloidtestes ist ein zusätzlicher Hinweis darauf, dass der Zustand $\mathbf{I_n}$ zurecht den Amyloidstrukturen der an Krankheiten beteiligten Proteinen gleichgesetzt wird.

Kleine Oligomere mit einer sphärischen oder elliptischen Form wurden auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Reaktionslösungen beobachtet (Abb.2.3). Sie stellen vermutlich Monomere bis Pentamere dar. Als oberste Grenze können im Sinne einer konservativen Abschätzung Dekamere angenommen werden.

Die Molekularität n im letzten Schritt von Gl.2.1, der die Amyloidbildungsreaktion repräsentiert, ist rein symbolisch zu verstehen, da das Produkt eine heterogene Verteilung von Amyloidfibrillen darstellt, die aus jeweils unterschiedlich vielen Monomeren aufgebaut sind. Darüberhinaus liegt der Polymerisierungsreaktion, die zu den Amyloidfibrillen führt, ein komplexer Mechanismus zugrunde, der aus mehreren Elementarschritten besteht und die Molekularität nur im Zusammenhang mit einem Elementarschritt einen sinnvollen

Begriff darstellt. Der Beschreibung der Polymerisierung der PGK in Form von Amyloidfibrillen, der Aufklärung des dahinterliegenden Mechanismus und der Identifizierung der Elementarschritte ist der Rest des Kapitels gewidmet.

2.4 Amyloidbildungsreaktion

Die Kinetik der Amyloidbildung der PGK wurde bei Proteinkonzentrationen von $3.3 \mu\text{M}$, $21.8 \mu\text{M}$, $60.6 \mu\text{M}$ und $154.8 \mu\text{M}$ in 10 mM HCl ($\text{pH } 2$) in H_2O untersucht. Die Salzkonzentration betrug jeweils 190 mM NaCl . Zusätzlich wurden bei sonst identischen Bedingungen Messungen in D_2O durchgeführt. Dies geschah vor allem zur Signal-Rausch-Verbesserung bei der Infrarotspektroskopie. Um die Parallelität mit den Lichtstreuungsmethoden zu wahren, wurden auch mit diesen Methoden Messungen in D_2O vorgenommen. Die Grundlagen zu den verwendeten biophysikalischen Methoden der statischen und dynamischen Lichtstreuung, des Circular dichroismus sowie der Infrarotspektroskopie können in den Anhängen A und B nachgelesen werden. Die durch sie gewonnenen Ergebnisse werden in den folgenden Unterkapiteln vorgestellt.

2.4.1 Statische und dynamische Lichtstreuung

Das Gewichtsmittel der scheinbaren Masse $M(t)$ der gebildeten PGK-Aggregate wurde mittels statischer Lichtstreuung (SLS) gemessen. Die Grösse der wachsenden Aggregate wurde durch dynamische Lichtstreuung (DLS) bestimmt. Das Maß für die Grösse der Partikel stellt der scheinbare, mittlere hydrodynamische Radius $R_S(t)$ dar. Dieser wird mittels der Stokes-Einstein-Gleichung (Gl.2.2) aus dem durch DLS bestimmten Diffusionskoeffizienten, analog dem im Unterkapitel 2.2 beschriebenen Vorgehen, berechnet. Das Adjektiv „scheinbar“ wird verwendet, um zu betonen, dass die betreffenden Grössen nicht nach unendlicher Verdünnung an Proteinkonzentration extrapoliert wurden, und die Daten damit eventuelle Virialeffekte noch explizit beinhalten können. Hierzu und generell zu den Grundlagen der statischen und dynamischen Lichtstreuung verweise ich auf Anhang A.

Die Größen $M_{rel}(t)$ und $R_{rel}(t)$ sind durch die Verhältnisse $M_{rel}(t) = M(t)/M(0)$ und $R_{rel}(t) = R_S(t)/R_S(0)$ definiert, wobei $M(0)$ und $R_S(0)$ die anfänglichen Werte zu Beginn der Experimente bezeichnen (vgl. Unterkapitel 2.2). Ihre Zeitverläufe sind in Abb.2.4 dargestellt. $M_{rel}(t)$ ist ein direktes Maß für die normierte, mittlere Aggregatmasse und daher direkt proportional zum zweiten Moment $\bar{n}(t) = \sum_i i^2 n_i(t)$ der Aggregatgrößenverteilung $n_i(t)$. Die Größe $R_{rel}(t)$ ist umgekehrt proportional zum z-gewichteten Mittel der Diffusionskoeffizienten mit der Aggregatgrößenverteilung $n_i(t)$ (s. Anhang A). Die logarithmischen Zeitachsen wurden gewählt, um die Messkurven der verschiedenen Proteinkonzentrationen in einem Diagramm übersichtlich darzustellen. Die Amyloidbildungsreaktion ist offensichtlich abhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration. Auf den untersuchten Zeitskalen der Reaktion trat keine Sättigung ein. Einige Proteinslösungen wurden bis zu sechs Monaten aufbewahrt und blieben über diesen gesamten Zeitraum transparent. Bei Kontrollmessungen wurde immer noch ein leichtes Anwachsen von $M_{rel}(t)$ und $R_{rel}(t)$ festgestellt.

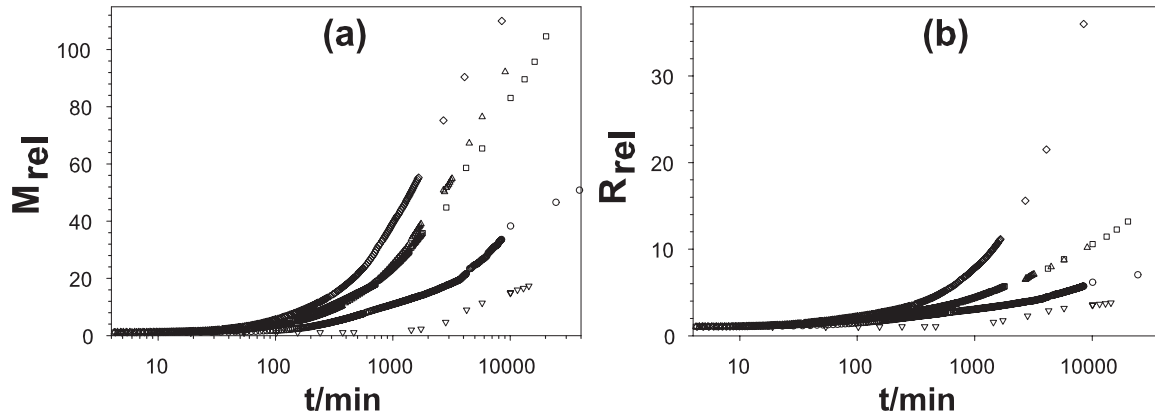


Abbildung 2.4: Amyloidbildungsreaktion von PGK beobachtet durch (a) SLS: $M_{rel}(t) = M(t)/M(0)$, (a) DLS: $R_{rel}(t) = R_S(t)/R_S(0)$. Die entsprechenden Proteinkonzentrationen waren: $3.3 \mu\text{M}$ (∇), $21.8 \mu\text{M}$ (\circ), $60.6 \mu\text{M}$ in D_2O (\triangle), $60.6 \mu\text{M}$ (\square), $154.8 \mu\text{M}$ (\diamond). Die Lösungsmittelbedingungen waren durchweg 190 mM NaCl (pH 2), 10 mM HCl, bis auf die hervorgehobene Messung, die in D_2O und 190 mM NaCl, 10 mM DCl durchgeführt wurde.

2.4.2 Circulardichroismus und Infrarotspektroskopie

Die Umwandlung der Sekundärstruktur während der Amyloidbildungsreaktion wurde mit Circulardichroismus (CD) und Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) beobachtet. Die CD-Spektren des Ausgangs- und Endzustandes wurden bereits in den vorhergehenden Unterkapiteln gezeigt (s. Abb. 2.3). In Abb. 2.5 (a) sind die Differenzspektren zum Ausgangszustand ($\Delta[\theta] = [\theta](t) - [\theta](0)$) im Wellenlängenbereich des fernen UV zwischen 195 nm und 235 nm zu sehen. Unterhalb von 195 nm nimmt die Absorption der Lösung stark zu, sodass kein CD-Signal mehr detektierbar ist. Oberhalb von 240 nm finden keine wesentlichen Änderungen mehr statt, weshalb das Spektrum dort abgeschnitten wurde. Mit fortlaufender Reaktionsdauer nehmen die Differenzspektren eine immer ausgeprägtere Form für β -Faltblattstrukturen an, was anhand des immer tiefer und breiter werdenden Tales zwischen 205 nm und 235 nm mit Talsohle bei 215 nm ersichtlich ist. Der unterhalb von 200 nm herauswachsende Berg spricht allerdings dafür, daß einiges an α -helikaler Struktur erhalten bleibt bzw. in geringeren Anteilen zusätzlich neu geformt wird.

Die Diskussion der äußerst detailreichen FTIR-Absolutspektren sowie ihrer zweiten Ableitungen für die native PGK und den amyloigenen Ausgangszustand würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Genaue und umfangreiche Ausführungen sind in [Damaschun et al., 2000] zu finden. Ich will mich auf die rein kinetischen Aspekte, die sich aufgrund der FTIR-Befunde ergeben, beschränken. In Abb. 2.5 (b) sind die FTIR-Differenzspektren zu sehen, die durch Abzug des Anfangsspektrums entstehen. Demnach gilt analog den CD-Differenzspektren für die Absorption A im Infraroten $\Delta A = A(t) - A(0)$.

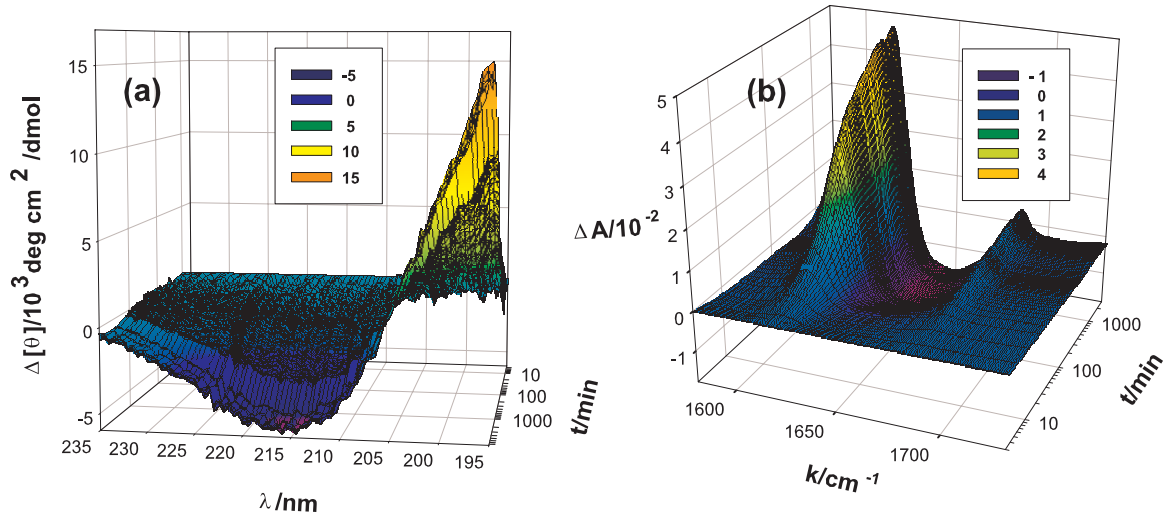


Abbildung 2.5: Umwandlung der Sekundärstruktur bei der Amyloidbildung von PGK (a) CD-Differenzspektren im fernen UV. Proteinkonzentration war $n_1 = 21.8 \mu\text{M}$ in 190 mM NaCl (pH 2), 10 mM HCl. (b) FTIR-Differenzspektren, die den Amid-I-Bereich umfassen. Die Proteinkonzentration war $n_1 = 154.8 \mu\text{M}$ in D_2O , 190 mM NaCl (pD 2), 10 mM DCl.

Die Differenzspektren umfassen den Wellenzahlenbereich der sogenannten Amid-I-Bande ($1600 \text{ cm}^{-1} < k < 1700 \text{ cm}^{-1}$). Die Absorption bei diesen Wellenzahlen beruht auf der Ankopplung des elektromagnetischen Wellenfeldes an die CO-Streckschwingung in der Peptidkette, deren Resonanz in diesem Bereich des Infraroten liegt. Änderungen der Absorption innerhalb der Bande kommen durch Umwandlungen der Sekundärstruktur des Proteins zustande. Der Vorteil der FTIR-Spektroskopie gegenüber der CD-Spektroskopie beruht auf erhöhter Sensitivität auf β -Faltblattstrukturen, sowie der Fähigkeit zwischen parallelen und antiparallelen Faltblattstrukturen differenzieren zu können. Die in Abb. 2.5 (b) hervortretenden Änderungen kommen hauptsächlich durch Umlagerung von intra- zu intermolekularen β -Faltblättern zustande [Damaschun et al., 2000] (vgl. auch Anhang B).

Die unterschiedliche Rauigkeit der Oberflächen der Differenzspektren in Abb. 2.5 lässt erkennen, dass die CD-Spektren mit einem wesentlichen höheren Rauschanteil behaftet sind als die FTIR-Spektren. Das CD-Signal wird in kleinen Zeitintervallen nacheinander, wellenlängenabhängig abgerastert, wohingegen bei der FTIR-Spektroskopie ein Interferenzmuster detektiert wird, indem die Informationen über die Absorptionen bei allen Wellenlängen gleichzeitig erfasst werden. Die Zeitverläufe der Änderungen ausgewählter Wellenlängen bzw. Wellenzahlen sind in Abb. 2.6 aufgetragen. Es wurde für die CD-Spektroskopie die Wellenlänge $\lambda = 215 \text{ nm}$ ausgewählt, die besonders sensibel auf Zunahme von β -Faltblättern reagiert. Die Differenzelliptizität wurde auf den Wert am Ende der

Reaktion $[\theta](\infty)$ normiert: $\Delta[\theta]_n = \frac{[\theta](t) - [\theta](0)}{[\theta](\infty)}$. Bei diesem Vorgehen musste teilweise der Endwert der Konversion $[\theta](\infty)$ extrapoliert werden, was mit einer gewissen Unsicherheit behaftet ist. Um Vergleichbarkeit mit den FTIR-Kinetiken zu gewährleisten, ist dieser

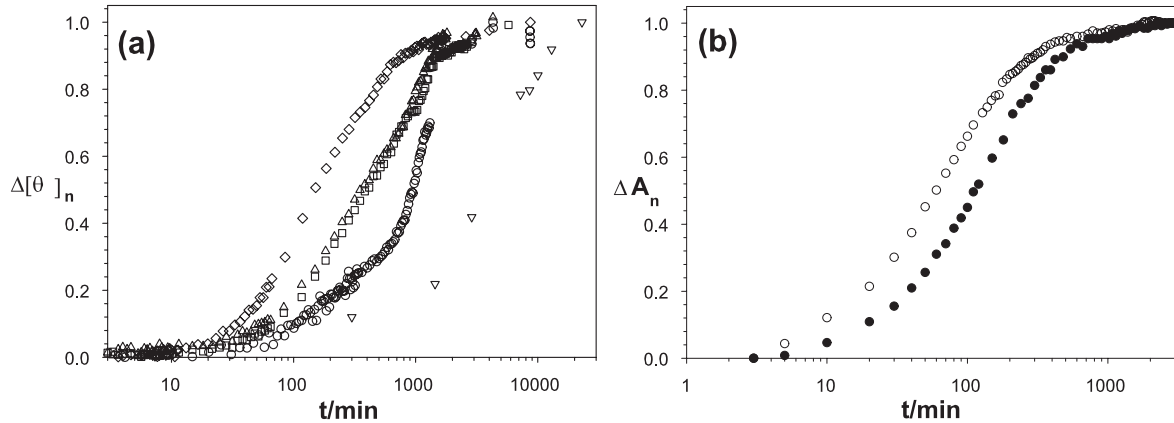


Abbildung 2.6: Zeitverläufe der Strukturkonversion: (a) CD bei der Wellenlänge $\lambda = 215$ nm. Die entsprechenden Proteinkonzentrationen waren: $3.3 \mu\text{M}$ (∇), $21.8 \mu\text{M}$ (\circ), $60.6 \mu\text{M}$ in D_2O (\triangle), $60.6 \mu\text{M}$ (\square), $154.8 \mu\text{M}$ (\diamond). Die Lösungsmittelbedingungen waren durchweg 190 mM NaCl (pH 2), 10 mM HCl in H_2O , bis auf die hervorgehobene Messung, die in D_2O und 190 mM NaCl, 10 mM DCl (pD 2) durchgeführt wurde. (b) FTIR bei der Wellenzahl $k = 1614 \text{ cm}^{-1}$. Die entsprechenden Proteinkonzentrationen waren: $60.6 \mu\text{M}$ (\bullet), $154.8 \mu\text{M}$ (\circ). Die Lösungsmittelbedingungen entsprachen denen der CD-Messung in D_2O .

Schritt aber unumgänglich. Repräsentativ für die FTIR-Daten wird der Verlauf bei der Wellenzahl $k = 1614 \text{ cm}^{-1}$ gezeigt. Änderungen bei dieser Wellenzahl gelten als Indikator für Änderungen des Gehaltes an antiparallelen, intermolekularen β -Faltblattstrukturen. Die Normierung der Differenzabsorptionen ΔA auf die Endwerte $A(\infty)$ ist im Falle dieser Messungen unproblematisch ($\Delta A_n = \frac{A(t) - A(0)}{A(\infty)}$), da die Messkurven ein deutliches Endplateau aufweisen, das die Sättigung der Strukturkonversion anzeigt.

Die Kurvenverläufe, die sich aus den Messungen beider Methoden ergeben, sind sehr ähnlich (Abb. 2.6). Es wurde jeweils eine logarithmische Zeitskala gewählt, um die Feinheiten der Verläufe hervortreten zu lassen. Nach einer anfänglichen Phase, bei der nur eine geringe Erhöhung der Signale stattfindet, tritt eine drastische Zunahme des Messsignals auf, die von einer Absättigung in einem konstanten Endplateau abgeschlossen wird. Die Strukturkonversion der Amyloidbildung von PGK ist offensichtlich abhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration (Abb. 2.6).

2.5 Reaktionsmechanismus

In diesem Unterkapitel werden die gesammelten Daten zur Amyloidbildungsreaktion näher beleuchtet. Im ersten Teil werden dazu rein phänomenologische Methoden verwendet, die nur ein Minimum an theoretischer Begrifflichkeit benötigen. Im Gegensatz dazu wird der Wachstumsprozess mit Konzepten der Aggregationstheorie von Kolloiden untersucht, deren Hintergründe in Anhang C erläutert werden. Der Mechanismus der Strukturkonversion, der während der Amyloidbildungsreaktion stattfindet, wird mit Methoden der modellfreien Datenanalyse, der sogenannten Faktorenanalyse, betrachtet. Dieses theoretische Analysewerkzeug stellt einen zentralen Bestandteil innerhalb der Chemometrik, einer Teildisziplin der analytischen Chemie, dar. Der Anhang D ist diesen Analysewerkzeugen gewidmet.

2.5.1 Phänomenologische Datenanalyse

Reaktionsordnung

Zur ersten kinetischen Klassifizierung der Amyloidbildungsreaktion der PGK wurde die Reaktionsordnung bestimmt. Abb. 2.7 zeigt die Kinetiken der verwendeten biophysikalischen Methoden, wobei die Zeitpunkte der Messwerte mit den jeweils dazugehörigen Proteinkonzentrationen multipliziert wurden. Die Zeitachsen wurden also mit der Proteinkonzentration reskaliert. Die Daten der verwendeten Untersuchungsmethoden fallen zusammen, sie superponieren auf einer gedachten Masterkurve. Leichte Abweichungen von diesem Verhalten treten erst für sehr große reskalierte Zeiten gegen Ende des Beobachtungszeitraums auf und spiegeln die experimentelle Streuung der Daten wider. Die Eigenschaft, die unabhängige Messgröße mit dem(n) variierten Parameter(n) einer Messreihe so skalieren zu können, dass die abhängigen Messgrößen auf einer Kurve kollabieren, wird in der Physik als dynamische Skalierbarkeit bezeichnet [de Gennes, 1979]. Da die Daten linear mit der Konzentration skalieren, ist die Amyloidbildungsreaktion der PGK eine Reaktion zweiter Ordnung. Allgemein würde bei Auftreten eines Datenkollapses durch Multiplikation mit der $(n-1)$ ten-Potenz der Konzentration gelten, dass die Reaktionsordnung n betragen würde [Moore and Pearson, 1981]. Generell ist es zwar unzulässig von der Reaktionsordnung direkt auf die Molekularität der beteiligten Elementarschritte des Mechanismus zu schließen [Moore and Pearson, 1981]. Es handelt sich aber um einen Wachstumsprozess, bei dem zwangsläufig Elementarschritte mit mindestens zwei beteiligten Reaktanten auftreten müssen. Elementarschritte mit drei und mehr Reaktionspartnern sind äußerst unwahrscheinlich und können generell vernachlässigt werden. Der Befund einer Reaktionsordnung, die gleich zwei ist, legt nahe, dass das reine Wachstum der Aggregate durch eine Sequenz bimolekularer Elementarschritte, deren intermediäre Zustände signifikant bevölkert werden, beschrieben werden kann.

Dimensionalität des Wachstums

Informationen über den Wachstumsprozess bei der Umwandlung der PGK zu Amyloidfibrillen können durch Auftragung der relativen Masse M_{rel} über den relativen hydrodyna-

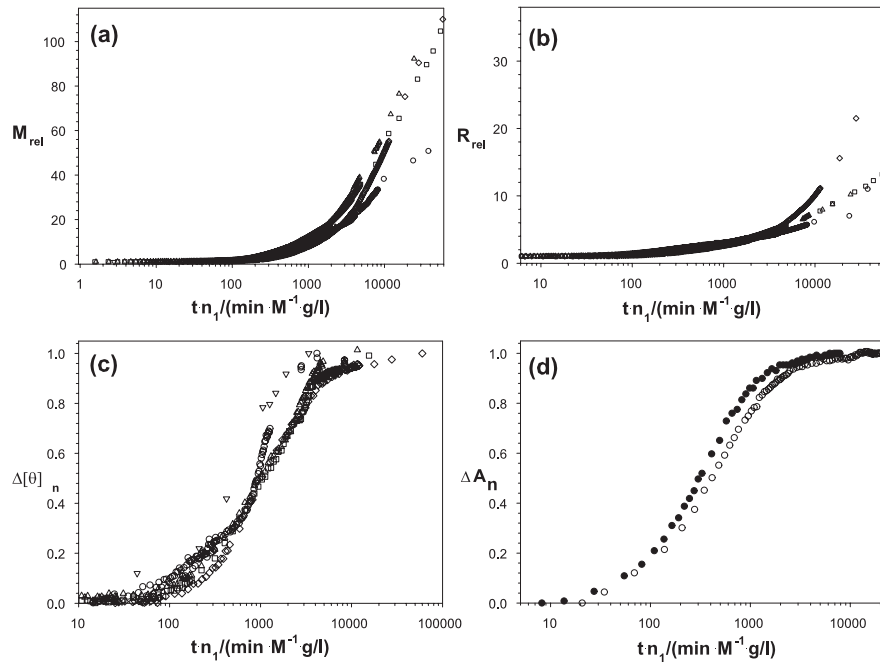


Abbildung 2.7: Reaktionsordnung der Amyloidbildungsreaktion von PGK: (a) Statische Lichtstreuung (SLS), (b) Dynamische Lichtstreuung (DLS), (c) Circular dichroismus (CD) bei $\lambda = 215$ nm, (d) Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR) bei $k = 1614\text{cm}^{-1}$. Die entsprechenden Proteinkonzentrationen waren: $3.3\text{ }\mu\text{M}$ (∇), $21.8\text{ }\mu\text{M}$ (\circ), $60.6\text{ }\mu\text{M}$ in D_2O (\triangle), $60.6\text{ }\mu\text{M}$ (\square), $154.8\text{ }\mu\text{M}$ (\diamond). Die Lösungsmittelbedingungen waren durchweg 190 mM NaCl ($\text{pH } 2$), 10 mM HCl in H_2O , bis auf die hervorgehobene Messung, die in D_2O und 190 mM NaCl , 10 mM DCl ($\text{pD } 2$) durchgeführt wurde. Die FTIR-Messungen wurden bei Proteinkonzentrationen von: $60.6\text{ }\mu\text{M}$ (\bullet), $154.8\text{ }\mu\text{M}$ (\circ) in D_2O durchgeführt.

mischen Radius R_{rel} aus einer doppellogarithmischen Darstellung, wie in Abb. 2.8 gezeigt, gewonnen werden. Durch dieses Vorgehen wird die Zeit explizit eliminiert und ein direkter Vergleich der bei verschiedenen Konzentrationen gemessenen Kinetiken ermöglicht. Die zugrundeliegende Annahme dieser Art der Datenauswertung ist, dass der Wachstumsprozess durch ein Massenskalengesetz der Form

$$M_{rel} \propto R_{rel}^d \quad (2.3)$$

beschreibbar ist. Der Exponent d gibt die Dimension des Wachstumsprozesses an. Lineares Wachstum, wie die Bildung von Stäben, wird durch $d = 1$ angezeigt. Die Dimension von $d = 3$ bedeutet volumenartiges bzw. sphärisches Wachstum in allen drei Raumrichtungen. Falls die Dimension d Werte zwischen diesen Grenzen annimmt, spricht man von einer fraktalen Dimension, die den Wachstumsprozess charakterisiert [Mandelbrot, 1983]. Eine Ausnahme kann der Wert $d = 2$ bedeuten, der unter Umständen auch Wachstum in einer

Fläche anzeigen kann. Das Konzept der fraktalen Dimension ist aber nur anwendbar, wenn das Wachstumsverhalten gemäß Gl. 2.3 mehrere Dekaden des Wertevorrates umschließt. Zwei unterschiedliche Wachstumsbereiche können in Abb. 2.8 klar unterschieden werden.

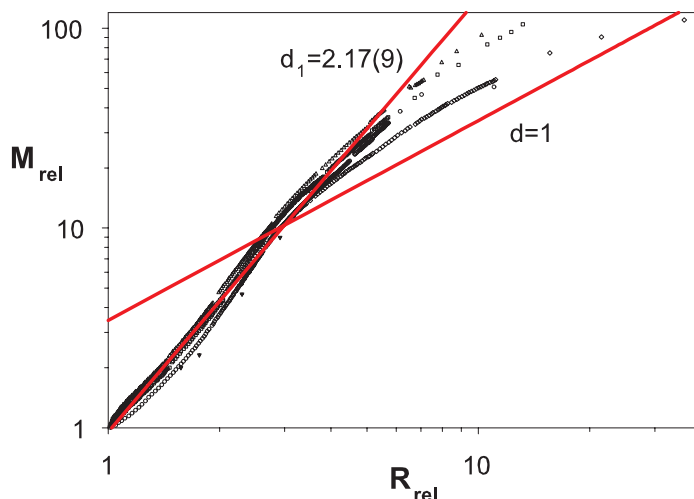


Abbildung 2.8: Dimensionalität des Fibrillenwachstums der PGK: Die entsprechenden Proteinkonzentrationen waren: $3.3 \mu\text{M}$ (∇), $21.8 \mu\text{M}$ (\circ), $60.6 \mu\text{M}$ in D_2O (\triangle), $60.6 \mu\text{M}$ (\square), $154.8 \mu\text{M}$ (\diamond). Die Lösungsmittelbedingungen waren durchweg 190 mM NaCl (pH 2), 10 mM HCl in H_2O , bis auf die hervorgehobene Messung, die in D_2O und 190 mM NaCl, 10 mM DCl (pD 2) durchgeführt wurde. Zwei Wachstumsregime können unterschieden werden. Die roten Linien zeigen Wachstum gemäß des Massenskalengesetzes (Gl.2.8) an. Die steilere Gerade, bezeichnet durch $d_1 = 2.17 \pm 0.09$, stellt die Anpassung an die Daten im Bereich $1 \leq M_{rel} \leq 10$ dar. Streng lineares Wachstum ab $M_{rel} = 10$ wird durch die flachere Linie mit $d = 1$ symbolisiert.

Bis zu einer relativen Masse von zehn Monomeren ($1 \leq M_{rel} \leq 10$) superponieren die Daten der verschiedenen Kinetiken. Der Exponent der sich ergebenden Masterkurve beträgt $d = 2.17 \pm 0.09$ und ist nicht ganzzahlig. Da dieses Verhalten aber höchstens eine Dekade des Wertebereichs überspannt, verbietet sich eine Interpretation im Sinne einer fraktalen Dimension. Ich verwende den gefundenen Wert der Dimension des ersten Wachstumsbereiches als eine rein phänomenologische Größe, die ich als Wachstum kleiner Oligomere auffassen. Bei kleinen Oligomeren können die einzelnen Monomerunterheiten noch nicht so gepackt werden, dass sich ein Exponent von $d = 3$ ergibt. Der Wert zwischen zwei und drei weist aber auf das Wachstum „volumenartiger“ Strukturen hin.

Der Übergang zur zweiten Wachstumsphase beginnt, wenn die relative Masse M_{rel} den Wert von zehn Monomeren überschreitet. Die Steigungen der Kurven nehmen immer mehr ab und fallen unterhalb des Wertes für zweidimensionales Wachstum. Oberhalb einer relativen Masse von etwa dreißig Monomeren ist die zweite Wachstumsstufe voll ausgeprägt. Die Steigungen d haben sich zwischen den Werten $1 < d < 5/3$ stabilisiert, wobei die untere

Grenze für streng lineares Wachstum steht, während die obere Schranke den Wert annimmt, der für eine sich selbstvermeidende Kette erwartet wird [de Gennes, 1979][Flory, 1953]. Das „wurmartige“ Erscheinungsbild der Fibrillen auf den Elektronenmikroskopieaufnahmen (vgl. Abb. 2.3) spiegelt sich quantitativ in diesem Wertebereich wider.

Änderung der Sekundärstruktur und Wachstum

Die gefundene Eigenschaft der dynamischen Skalierbarkeit ermöglicht es, die Änderung der Sekundärstruktur und der Quartärstruktur miteinander, wie in Abb.2.9 gezeigt, in Beziehung zu setzen. Dadurch wird die Zeit analog dem vorhergehenden Abschnitt eliminiert. Die Daten der verschiedenen CD-Kinetiken ($\Delta\theta_n$ bei $\lambda = 215$ nm), die über den relativen Massen M_{rel} aus der SLS aufgetragen wurden, fallen näherungsweise aufeinander. Das gezeigte FTIR-Signal ΔA_n wurde bei einer Wellenzahl k von $k = 1614\text{cm}^{-1}$ detektiert. Aus der linearen Darstellung Abb.2.9(a) ist ersichtlich, dass oberhalb einer relativen Mas-

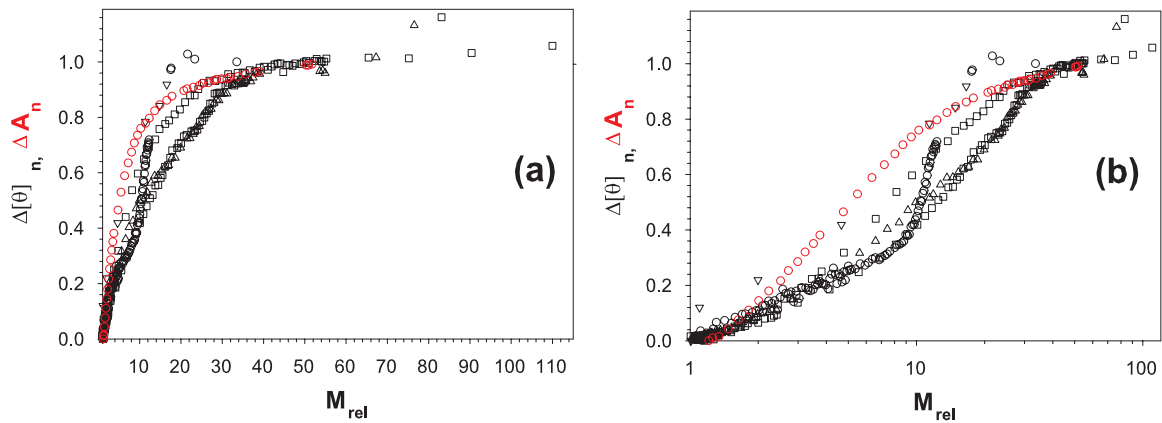


Abbildung 2.9: Kopplung der Sekundär- und Quartärstrukturänderung, wobei die Änderungen der Sekundärstruktur durch CD ($\Delta\theta_n$) und FTIR (ΔA_n) erfaßt wurden. Als Indikator der Änderung der Quartärstruktur wird die relative Masse M_{rel} aus der SLS herangezogen. Die entsprechenden Proteinkonzentrationen waren: $3.3 \mu\text{M}$ (∇), $21.8 \mu\text{M}$ (\circ), $60.6 \mu\text{M}$ in D_2O (\triangle), $60.6 \mu\text{M}$ (\square), $60.6 \mu\text{M}$ in D_2O (\circ), $154.8 \mu\text{M}$ (\diamond) in H_2O , 190 mM NaCl (pH 2), 10 mM HCl, bis auf die hervorgehobenen Messungen, die in D_2O und 190 mM NaCl, 10 mM DCl (pD 2) durchgeführt wurden. In (a) sind die Daten über einer linearen Abszisse dargestellt. Das Verwenden einer logarithmischen Abszisse in (b), lässt zwei separate Bereiche erkennen.

se von dreißig Monomeren ($M_{rel} > 30$) praktisch keine Änderungen der Sekundärstruktur mehr auftreten. Die Signalverläufe erreichen ein Endplateau mit einem stabilen Sättigungswert. Die Auftragung mit einer logarithmischen Abszisse führt zum Hervortreten zweier Bereiche, die qualitativ anhand des unterschiedlichen Verlaufs der Datenpunkte erkennbar sind. Der Übergang zwischen beiden Bereichen findet recht scharf bei einer relativen Masse von zehn Monomeren statt ($M_{rel} > 10$). Die Masse, welche die Trennlinie beider

Umwandlungsstufen markiert, entspricht also auch jener, bei der sich die Dimensionalität des Wachstumsprozesses ändert.

Die beobachtete relative Änderung der Signale bei der Masse von zehn Monomeren hängt allerdings von der verwendeten Methode ab. Im Falle der CD-Spektroskopie hat sich der Wert der normierten molaren Differenzelliptizität etwa um 50% erhöht. Die Zunahme des FTIR-Signals beträgt dagegen schon 80%. Diese Diskrepanz erklärt sich durch die unterschiedliche Sensitivität auf verschiedene Sekundärstrukturelemente, sowie die verschiedenen physikalischen Prinzipien, auf denen die Methoden basieren. Die unterschiedlichen Bereiche sind aber auch deutlich aus der qualitativen Änderung des FTIR-Signalverlaufes ablesbar.

2.5.2 Wachstumsprozess

Die Amyloidbildung von PGK ist im Wesentlichen irreversibel. Formal wurde dieser Eigenschaft bereits schon in der Reaktionsgleichung 2.1 im letzten Reaktionsschritt Ausdruck verliehen. Experimentell wird das durch zwei Befunde gestützt. Die Wachstumskurven der SLS und der DLS münden auch für die längsten Beobachtungszeiträume nicht in einem Endplateau, das die Sättigung der Reaktion und damit das Erreichen des Gleichgewichts anzeigen würde. Das Verdünnen einer Reaktionslösung führt nicht zur Auflösung der gebildeten Aggregate in Monomere. Die Reaktion verläuft mit entsprechend der Verdünnung herabgesetzter Rate in Richtung der Produktbildung weiter.

Die Eigenschaft der Irreversibilität erlaubt gemeinsam mit der Annahme, dass der Polymerisierungsmechanismus aus bimolekularen Elementarschritten aufgebaut ist, die Modellierung der Wachstumskurven der LS. Dabei stellte sich heraus, daß Theorien, die zur Beschreibung der Aggregation von Kolloiden aufgestellt wurden, hervorragend zur Anpassung der Daten geeignet sind [Modler et al., 2003]. Die ursprüngliche Koagulationstheorie von Kolloiden geht auf die Pionierarbeiten von Marian von Smoluchowski aus dem Jahr 1916 zurück [Smoluchowski, 1916, Smoluchowski, 1917]. Das Konzept des Fraktals und die Entdeckung fraktaler Wachstumsprozesse erweckte neues Interesse an diesen kolloiden Wachstumsphänomenen und führte zu verallgemeinerten theoretischen Konzepten [Vicsek, 1992]. Smoluchowski-Koagulationstheorie wurde innerhalb der Proteinchemie kaum zur Beschreibung der Aggregation von Proteinen herangezogen [Jaenicke and Seckler, 1997]. Dies mag vielleicht eine langfristige psychologische Nachwirkung des Makromolekül/Kolloid-Disputs sein, den die Proteinchemiker zu ihren Gunsten entschieden. Konzepte der Kolloidchemie schienen seitdem in der Proteinchemie nicht mehr salonfähig zu sein oder haben zumindestens mit verstärkten Akzeptanzproblemen zu kämpfen [Tanford and Reynolds, 2001].

Nach bestem Wissen des Autors wurde Smoluchowski-Koagulationstheorie zum ersten Mal 1984 auf die Hitzeaggregation von Immunglobulinen (IgG) in den Proteinwissenschaften angewandt [Feder et al., 1984]. Spätere Studien hatten die Proteinkristallisation [Umbach et al., 1998] und die Bildung von sogenannten Einschlußkörpern [Speed et al., 1997], die bei der Proteinüberexpression entstehen können, zum Gegenstand. Es existieren nur zwei Arbeiten, die Smoluchowski-Koagulationstheorie zur Modellierung

später Phasen der Amyloidbildung von A β -Peptiden benutzen [Tomski and Murphy, 1992, Thunecke et al., 1998].

Die Grundlagen der Smoluchowski-Koagulationstheorie und deren Verallgemeinerungen sind in Anhang C ausführlich dargelegt. Die wesentlichen Merkmale sind hier nur in aller Kürze aufgeführt. Das Wachstum findet durch irreversible bimolekulare Reaktionen statt. Aggregate, die aus einer beliebigen Anzahl von Monomeren aufgebaut sind, können miteinander reagieren. Ein n -mer kann also aus einem $n - 1$ -mer und einem Monomer, einem $n - 2$ -mer und einem Dimer usw. geformt werden. Der Aggregationsmechanismus besteht also aus Kaskaden paralleler bimolekularer Reaktionen, die durch die angedeuteten verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten die Bildung n -merer Zwischenprodukte erlauben. Als Ergebnis der Reaktion erhält man immer eine heterogene Verteilung der verschiedensten Aggregatgrößen. Im einfachsten Fall wird die Ratenkonstante k für alle Reaktionsschritte als Konstante angesetzt. Das normierte Gewichtsmittel M_{rel} berechnet sich dann zu

$$M_{rel} = 1 + 2t/t_c \quad , \quad (2.4)$$

wobei t_c die Koagulationszeit ist. Sie gibt die Zeitskala vor, auf der die Partikel zu größeren Aggregaten koagulieren. Die Koagulationszeit ist mit der Ratenkonstante durch die Beziehung $t_c = 2/(k \cdot n_1)$ verknüpft. Die Ratenkonstante k wird üblicherweise in Einheiten der Smoluchowski-Ratenkonstante k_s gemessen (vgl. Anhang C). Diese definiert die maximal erlaubte Obergrenze, mit der Reaktionen in Lösungen überhaupt ablaufen können. Es handelt sich dann um diffusionskontrollierte Reaktionen. Das Verhältnis $\alpha = k/k_s$ heisst Klebewahrscheinlichkeit (engl. sticking probability). Sie gibt an, welcher Bruchteil erfolgreicher Stöße tatsächlich zu einer erfolgreichen Reaktion zwischen den Reaktionspartnern führt.

Erste Wachstumsphase

Formel 2.4 wurde an die Kinetiken mit den unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen n_1 der SLS von Abbildung 2.4 (a) für die erste Wachstumsstufe ($M_{rel} < 10$) angepasst. Der einzige freie Parameter ist die Koagulationszeit t_c . Einsetzen des Massenskalengesetzes Gl. 2.3 mit den Exponenten $d_f = 2.17$ für die erste Wachstumsphase, der aus Abbildung 2.8 gewonnen wurde, in Gl. 2.4 ergibt die Anpassungsfunktion $R_{rel} = (1 + 2t/t_c)^{1/2.17}$ für den normierten hydrodynamischen Radius R_{rel} . Diese Formel wurde an die DLS-Daten der Abb. 2.4 (b) für die Wertepaare der ersten Stufe angepasst. Die Ergebnisse sind in Abb. 2.10 (a) eingezeichnet und bestätigen die vorhergesagte Proportionalität $t_c^{-1} \propto n_1$ der Smoluchowski-Theorie und die zuvor phänomenologisch gefundene Reaktionsordnung. Innerhalb der Streubreite der Daten erhält man die gleiche Proportionalitätskonstante aus den unabhängigen Anpassungen an die SLS- und DLS-Daten, was die Selbstkonsistenz der Vorgehensweise demonstriert. Jossang et al. [Jossang et al., 1985] stießen bei der völlig analogen Auswertung ihrer Daten auf jeweils um einen Faktor zwei auseinanderklaffende Proportionalitätskonstanten. Verglichen mit dieser Studie stimmen unsere Befunde wesentlich besser mit der Theorie überein.

Die Klebewahrscheinlichkeit für die erste Wachstumsphase α_1 wurde aus dem Wert der Steigung der Ausgleichsgeraden $k = 3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ in Abb. 2.10 (a) zu $\alpha_1 \approx 9 \times 10^{-10}$ berechnet.

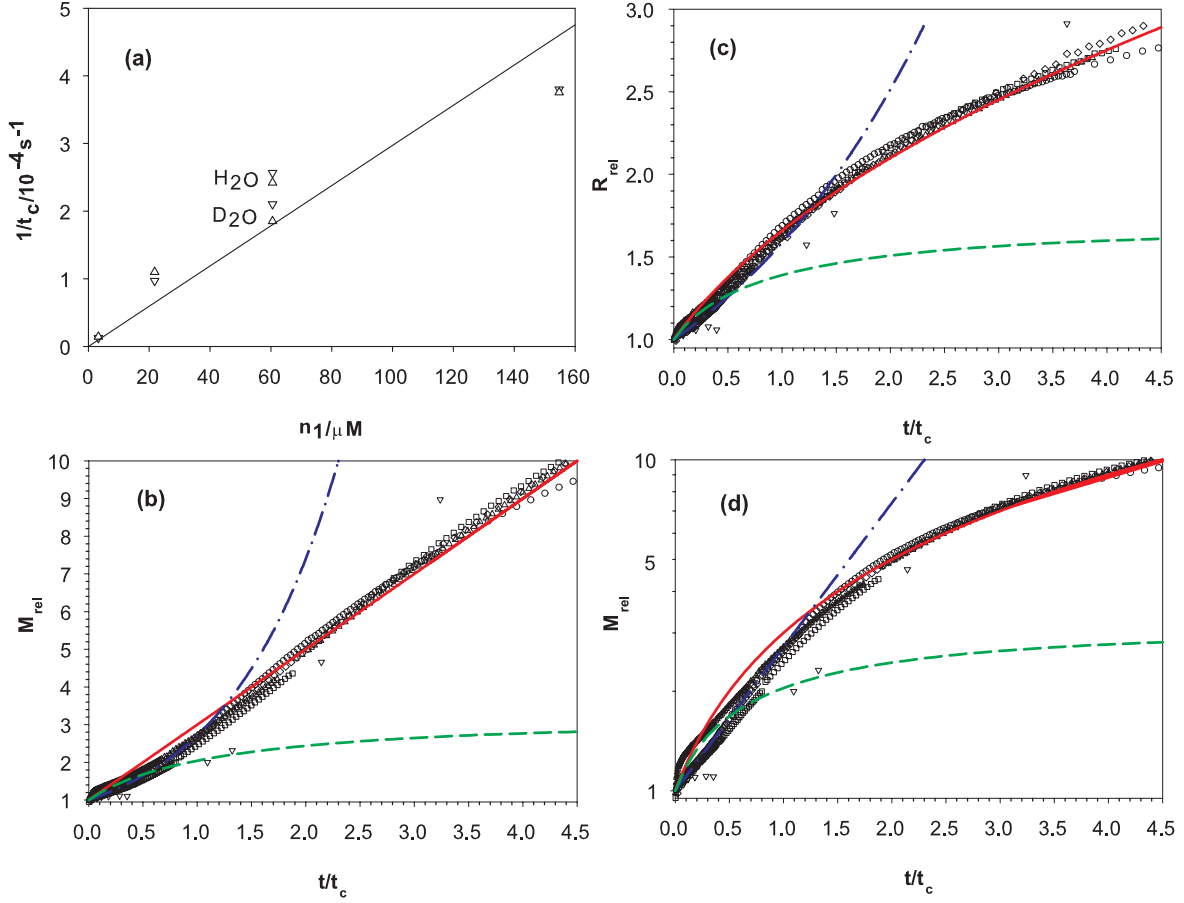


Abbildung 2.10: Anwendung der Smoluchowski-Koagulationstheorie auf die erste Wachstumsphase von PGK ($1 < M_{\text{rel}} < 10$). (a) inverse Koagulationszeit t_c über der PGK-Konzentration. t_c wurde durch Anpassung der Gleichung 2.4 an die SLS-Messungen (∇) oder durch unabhängige Anpassung der Gleichung $R_{\text{rel}}(t) = (1 + 2t/t_c)^{1/2.17}$ an die DLS-Daten (Δ) bestimmt, die in der Abbildung 2.4 (a) und (b) dargestellt sind. Der proportionale Zusammenhang bestätigt die Annahme bimolekularer Reaktionen als Ursache des Wachstums. Die Steigung ist gleich $3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die gezeigten Proteinkonzentrationen in (b)-(d) sind: $3.3 \mu\text{M}$ (∇), $21.8 \mu\text{M}$ (\circ), $60.6 \mu\text{M}$ in D_2O (Δ), $60.6 \mu\text{M}$ (\square), $154.8 \mu\text{M}$ (\diamond). M_{rel} als Funktion der reskalierten Zeit t/t_c ist in (b) linear und in (d) semilogarithmisch aufgetragen. (c) zeigt R_{rel} über t/t_c . Die rote Kurve repräsentiert die Lösung der Smoluchowski-Theorie in (b)-(d). Sequentielle Monomeraddition ist in jeder Teilabbildung durch die grüne, gestrichelte Kurve eingezeichnet. Die blaue, gepunktgestrichelte Kurve zeigt das Ergebnis für RLCA, die durch einen exponentiellen Zeitverlauf charakterisiert ist.

Für die Smoluchowski-Ratenkonstante wurde dabei der Wert $k_s = 6.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ benutzt (vgl. Anhang C Gl. C.8). Jedes kinetische Experiment für $M_{\text{rel}}(t)$ und $R_{\text{rel}}(t)$ wurde mit dem

dazugehörigen Wert der Koagulationszeit t_c , der aus der jeweiligen Anpassung gewonnen wurde, reskaliert. Die resultierenden Masterkurven sind in Abbildung 2.10 (b) und (c) aufgetragen. Die Übereinstimmung mit den erwarteten Kurvenverläufen der Smoluchowski-Koagulationstheorie ist innerhalb der Streuung der experimentellen Fehler überzeugend.

Ausschluss der sequentiellen Monomeraddition

Die Ergebnisse für M_{rel} unter der Annahme, dass Wachstum durch irreversible, sequentielle Addition von nur monomerem Protein an die wachsenden Oligomere stattfindet, sind ebenfalls in Abb. 2.10 (b)-(d) eingezeichnet. Die Ratengleichungen des Mechanismus sind in Anhang C mathematisch formuliert und diskutiert. Die resultierenden Kurven gehen sehr früh in ein Plateau über und weichen damit dramatisch von den experimentellen Daten ab. Die frühe Sättigung der Kurven erklärt sich durch den raschen Verbrauch der Monomere, durch die das Wachstum ja nur stattfinden kann. Dieses Verhalten zeigt die Notwendigkeit Reaktionen zwischen den verschiedensten Oligomergrößen bei irreversiblen Reaktionen zu erlauben, um effektives Wachstum des Gewichtsmittels produzieren zu können.

Verfeinerte Beschreibung

Die erste Wachstumsstufe ist in Abb. 2.10 (d) in halblogarithmischer Form dargestellt. Die Ausgleichsgerade gemäß Gleichung 2.4 überschätzt für kurze Zeiten ($t/t_c < 1$) und mittlere Massen ($M_{rel} < 3$) systematisch die gemessenen Werte. Bei dieser Lösung wurden die Ratenkonstanten als unabhängig von den beteiligten Aggregatengrößen angesetzt. Tatsächlich passt ein exponentieller Kurvenverlauf die Daten in diesem Bereich besser an. Diesem Verhalten kann durch Einbeziehen der Größenabhängigkeit der Ratenkonstanten Rechnung getragen werden. Das geschieht am überzeugendsten, indem eine Homogenitätsrelation für die Ratenkonstanten gefordert wird. Diese Relation wird durch einen Exponenten λ charakterisiert, der die Größenabhängigkeit der Ratenkonstanten misst. Die genauen Details sind in Anhang C beschrieben. Die Smoluchowski-Koagulationstheorie mit den größenabhängigen Ratenkonstanten legt Lösungen für M_{rel} nahe, die untenstehende funktionale Form aufweisen:

$$M_{rel}(t) = (1 + 2t/t_c)^z \quad \text{mit} \quad z = \frac{1}{1 - \lambda} \quad . \quad (2.5)$$

Für $\lambda = 0$ ist $z = 1$ und man erhält das bereits bekannte Ergebnis für konstante Ratenkonstanten Gl. 2.4. Im Grenzfall kleiner Klebewahrscheinlichkeiten $\alpha \rightarrow 0$ und $\lambda \rightarrow 1$ geht der Ausdruck Gl. 2.5 in eine exponentielle Form über

$$\lim_{\substack{\lambda \rightarrow 1 \\ \alpha \rightarrow 0}} M_{rel}(t) \propto \exp[Ct] \quad . \quad (2.6)$$

Dieses Wachstumsregime heißt reaktionslimitierte Clusteraggregation (RLCA). Der anfängliche Verlauf in Abb. 2.10 (d) fällt scheinbar in dieses Regime. Der schnelle Übergang zum linearen Verhalten spricht aber dafür, die erste Wachstumsphase dem sogenannten

Übergangsbereich (XOVER) zu zuordnen. Dessen Zustandekommen und zugrundeliegender Mechanismus sind allerdings noch nicht endgültig geklärt (vgl. Anhang C). Es sind aber in der Literatur Zeitverläufe beschrieben, die den gemessenen Kurven der ersten Wachstumsphase qualitativ entsprechen [Odriozola et al., 2001a], und damit die Einordnung in den XOVER-Bereich plausibel machen.

Zweite Wachstumsphase

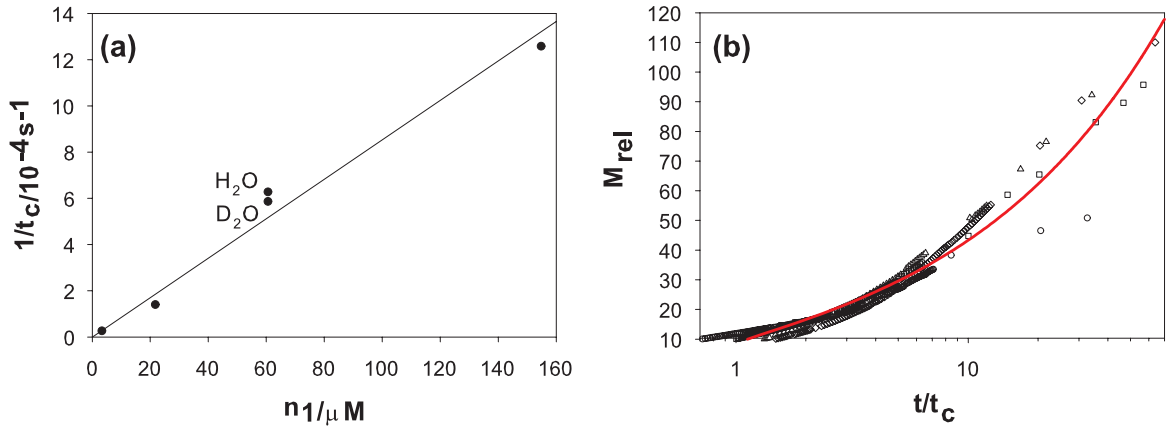


Abbildung 2.11: Beschreibung der zweiten Wachstumsphase von PGK ($M_{rel} > 10$) durch die verfeinerte Koagulationstheorie (Gl. 2.5). (a) Die inverse Koagulationszeit t_c^{-1} ist im Rahmen der Datenstreuung proportional zur PGK-Konzentration. Die Proportionalitätskonstante beträgt $0.8 M^{-1}s^{-1}$. (b) M_{rel} ist über t/t_c jeweils für die Proteinkonzentrationen $3.3 \mu M$ (∇), $21.8 \mu M$ (\circ), $60.6 \mu M$ in D_2O (\triangle), $60.6 \mu M$ (\square), $154.8 \mu M$ (\diamond) abgetragen. Die Anpassung (rote Kurve) ergab einen dynamischen Skalierungsexponenten von $z = 0.5$. Die logarithmische Zeitachse wurde gewählt, um eine Beurteilung der Genauigkeit der Anpassung für kurze Zeiten ($t/t_c < 10$) zu erlauben.

Zur Analyse der zweiten Wachstumsphase wurde die Zeitdauer der ersten Phase ($4.5 \times t_c(n_1)$) von jeder Kinetik abgezogen, wobei jeweils die dazugehörige Proteinkonzentration n_1 eingesetzt wurde. Die Masse wurde auf den Wert $M_{rel}(4.5 \times t_c) = 10$ reskaliert. Die Daten wurden mit der allgemeineren Form für $M_{rel}(t)$ (Gl. 2.5) angepasst. Die Messzeit des jeweiligen Experimentes wurde mit der jeweiligen Koagulationszeit t_c aus der entsprechenden Anpassung reskaliert. Aus Abb. 2.11 (b) ist ersichtlich, dass die Messwerte wieder zusammenfallen. Die erwartete Proportionalität $t_c^{-1} \propto n_1$ wird durch Abb. 2.11 (a) bestätigt. Aus der Steigung der Ausgleichsgeraden wurde ein Wert von $\alpha_2 = 2.4 \times 10^{-10}$ für die Klebewahrscheinlichkeit der zweiten Stufe berechnet. Der Wert des Exponenten z ergab sich näherungsweise zu $z = 0.5$, woraus $\lambda = -1$ folgt. Während der zweiten Wachstumsstufe werden Fibrillen gebildet. Wachstum erfolgt nur an den Enden dieser länglichen Strukturen. Der Reaktionsradius ist proportional dem Durchmesser der Fibrillen. Er ändert sich

demnach während der Reaktion nicht mehr. Dagegen führt die Verlängerung der Fibrillen zur Abnahme ihres Diffusionskoeffizienten. Zusammengefasst führen beide Einflüsse zu einer Abnahme der Reaktionsrate mit wachsender Fibrillenlänge. Dieses Verhalten findet mathematisch seinen Niederschlag im Ausdruck für die Ratenkonstante Brownscher Teilchen Gl. C.6 und erklärt das negative Vorzeichen von λ (vgl. Anhang C). Der Wert des Exponenten $\lambda = -1$ wurde auch bei radikalischen Polymerisationsreaktionen in organischen Lösungsmitteln von linearen Homopolymeren gefunden [Wisnudel and Torkelson, 1996]. Das Rouse-Modell für Kettenmoleküle liefert die gleiche Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von der Kettenlänge ($D \propto L^\lambda$ mit $\lambda = -1$) [Doi and Edwards, 1986].

2.5.3 Analyse der Konformationskonversion

Die kinetische Messung ganzer Spektren während der Amyloidbildungsreaktion der PGK erlaubt der Frage nach der Anzahl der spektroskopisch unterscheidbaren Bestandteile des Reaktionsgemisches, den sogenannten Faktoren, nachzugehen. Die dazu erforderlichen Grundlagen und Methoden sind ausführlich in Anhang D erklärt. Mittels der Singulärwertzerlegung wurden die Datensätze, die der Abb. 2.5 zugrundeliegen, analysiert. Zusätzlich wurde noch eine FTIR-Messung, bei der eine PGK-Konzentration von $60.6 \mu\text{M}$ eingesetzt wurde, mit einbezogen. Die sonstigen Bedingungen entsprachen denen der FTIR-Daten, die mit einer Konzentration von $154.8 \mu\text{M}$ gewonnen wurden. Die untenstehenden Ergebnisse stammen aus der Analyse der jeweiligen Absolutspektren.

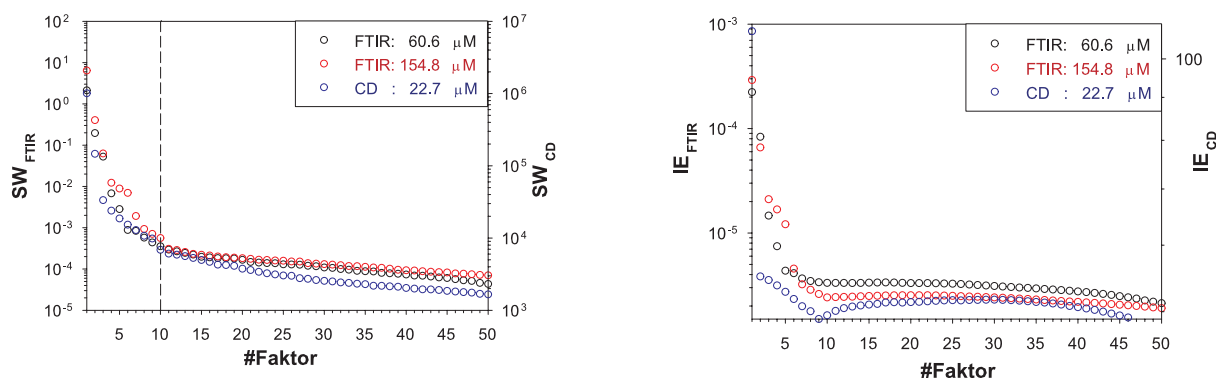


Abbildung 2.12: Faktoranalyse: (links) Singulärwerte (SW), (rechts) eingebetteter Fehler (IE). IE nimmt für die jeweils aufgeführte Anzahl an Faktoren der entsprechenden Messreihe ein lokales Minimum an: 13 (○), 10 (○), 9 (○).

Die Singulärwerte (SW) der Faktoren lassen sich in zwei Gruppen unterteilen, wie in Anhang D näher erläutert wird. Die primären SW sind für die eigentlichen Signale verantwortlich. Die sekundären SW beschreiben nur noch das im Datensatz enthaltene Rauschen. Ihre Werte sind im Vergleich zu den primären SW deutlich geringer. Aus Abbildung 2.12 kann entnommen werden, dass die Trennlinie zwischen diesen beiden Gruppen etwa beim zehnten Faktor verläuft. In der gleichen Abbildung ist die eingebettete Fehlerfunktion ge-

zeigt (IE), die im Idealfall bei der Anzahl der primären Faktoren ein lokales Minimum besitzt (s. Anhang D). Die Minima in Abb. 2.12 verlaufen teilweise sehr flach, was zu einer Überschätzung der Faktoren führen kann. Das trifft insbesondere auf die FTIR-Daten zu, bei denen die Ausgangskonzentration $60.6 \mu\text{M}$ betrug. Die Schätzung auf ungefähr neun bis zehn primäre Faktoren erscheint plausibel und stimmt mit der aus der Betrachtung der SW abgeleiteten Anzahl überein. In Tabelle 2.1 sind zusätzliche Ergebnisse für die Anzahlen der primären Faktoren aufgelistet. Die dabei verwendeten Kriterien tendieren dazu, die tatsächliche Anzahl zu unterschätzen. Im Zuge dieser Analysen ergab sich, dass der CD-Datensatz aufgrund seines schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses die Anzahlen systematisch zu niedrig ansetzt. Sein Rauschanteil ist zu groß, um ihn einer verlässlichen Faktoranalyse unterziehen zu können. Aufgrund der Kriterien von Tab. 2.1 kann auf etwa fünf bis sechs Faktoren geschlossen werden. Zusammenfassend kann der Bereich von fünf bis

Kriterium	CD: $22.7 \mu\text{M}$	FTIR: $60.6 \mu\text{M}$	FTIR: $154.8 \mu\text{M}$
$\mathbf{C} > 0.5$	2/3	5	6
$\mathbf{C} > 0.3$	3/3	7	10
RESO	2	5	6

Tabelle 2.1: Anzahl der primären Faktoren. \mathbf{C} ist der Autokorrelationskoeffizient erster Ordnung. Bei dem CD-Datensatz bezieht sich der erste Wert auf die Konzentrationsprofile, während der zweite Wert aus Analyse der Spektren erhalten wurde. Zur Erklärung des RESO-Kriteriums s. Anhang D.

zehn Faktoren als verlässliche Schätzung angesehen werden. Abzug des Eduktes und Produktes, die jeweils für einen Faktor verantwortlich sind, lässt auf drei bis acht intermediäre Zustände schließen. Aus der Singulärwertzerlegung werden neben den SW auch abstrakte Spektren und abstrakte Konzentrationsprofile gewonnen (s. Anhang D). Die ersten acht Profile sind exemplarisch für die FTIR-Messreihe, bei der die PGK-Konzentration $154.8 \mu\text{M}$ betrug, in Abbildung 2.13 aufgetragen. Die ersten sieben Profile enthalten klar erkennbare Signalverläufe. Zugegebenermaßen verschlechtert sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis mit steigender Profilnummer. Es können dem achten Profil kaum mehr nennenswerte Signalanteile zugeschrieben werden. Aufgrund dieser Betrachtung der abstrakten Profile, würde die Anzahl der primären Faktoren mit sieben beziffert werden. Folglich würden auch fünf Intermediate während der Strukturkonversion auftreten.

Die Verläufe weisen den Aufbau vorübergehender, ausgeprägter Maxima auf (Profil 1,3-7). Damit sind sie charakteristisch für Reaktionen, bei denen in bedeutendem Maße intermediäre Zustände bevölkert werden. Das zweite Profil zeigt einen Kurvenverlauf, der typisch für den Verbrauch des Edukts ist. Er fällt monoton ab, ohne dass ein Extremum vorübergehend angenommen würde.

2 Zur Amyloidbildung von Phosphoglyceratkinase

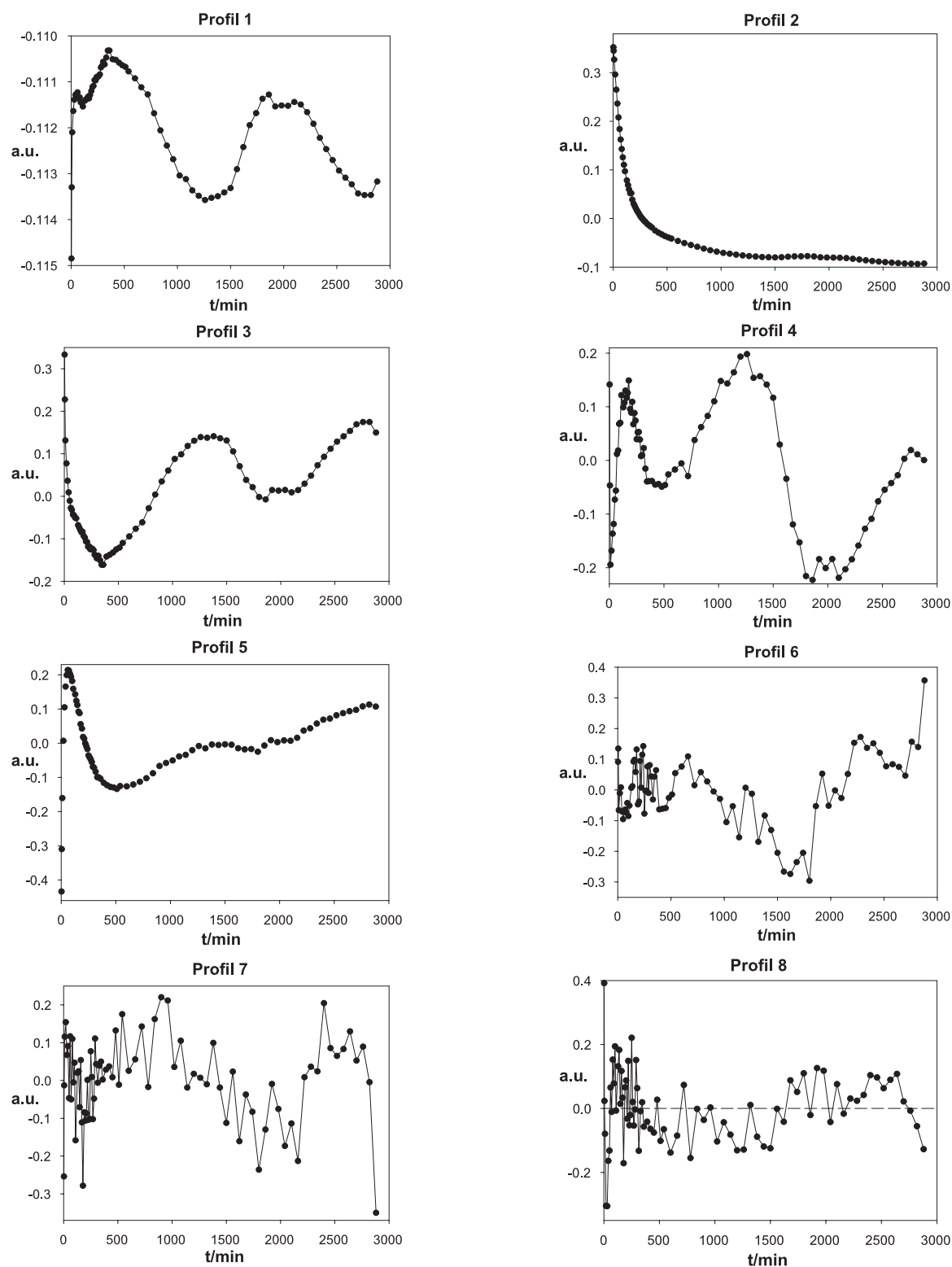


Abbildung 2.13: Konzentrationsprofile der ersten acht Faktoren des FTIR-Datensatzes, bei dem die Proteinkonzentration $154.8 \mu\text{M}$ betrug.

2.6 Verallgemeinertes Diffusions-Kollisions-Modell

Für die Aggregatzustände, die während der Amyloidbildung der PGK auftreten, ergibt sich unter Berücksichtigung aller Befunde das in Abbildung 2.14 skizzierte Schema. Die erste Wachstumsphase findet durch Clustern im XOVER-Bereich statt. Die Klebewahrscheinlichkeit ist extrem niedrig und beträgt $\alpha_1 = 9 \times 10^{-10}$. Der Wachstumssexponent, der in das Massenskalengesetz eingeht, nimmt den Wert $d_f = 2.17 \pm 0.09$ an. Der ganze Prozess dauert die viereinhalbfache Koagulationszeit t_c . Die gebildeten Oligomere besitzen eine mittlere Masse von zehn Monomereinheiten.

Während der zweiten Wachstumsphase treten Strukturen mit der Morphologie von Fibrillen auf. Diese entstehen durch Verschmelzen der Oligomere, die von der ersten Wachstumsstufe geliefert werden. Sie sind zwischen 50 nm und 250 nm lang. Diese Werte wurden von den elektronenmikroskopischen Aufnahmen und den hydrodynamischen Radien abgeschätzt. Letztere wurden unter der Annahme eines Durchmessers von 8 nm und der Persistenz steifer Stäbchen in Längen umgerechnet [de la Torre and Bloomfield, 1981]. Die Kinetik zeichnet sich durch abnehmende Ratenkonstanten zwischen den beteiligten Fibrillen bzw. Oligomeren und einer Klebewahrscheinlichkeit von $\alpha_2 = 2.4 \times 10^{-10}$ aus.

Größenordnung der Klebewahrscheinlichkeit

Die bimolekularen Ratenkonstanten beider Wachstumsphasen sind etwa zehn Größenordnungen kleiner als die theoretische Obergrenze der Smoluchowski-Ratenkonstante. Folglich ergeben sich Klebewahrscheinlichkeiten von $\alpha \approx 10^{-10}$. Die Klebewahrscheinlichkeit für die Hitzeaggregation von IgG liegt im gleichen Bereich [Feder et al., 1984].

Protein-Protein-Bindungsreaktionen wie z.B. die Antikörper-Antigen-Komplexbildung finden mit Klebewahrscheinlichkeiten im Bereich von $\alpha \approx 10^{-3}$ statt [Northrup and Erickson, 1992]. In diesen Fällen besitzen die Reaktionspartner eine weitestgehend ausgeprägte Tertiärstruktur und die Reaktionszentren an ihren Oberflächen sind im Wesentlichen vorgeformt. Der Ausgangszustand der PGK stellt dagegen ein großes Ensemble an Konformationen ohne definierte Tertiärstruktur dar. Eine plausible Erklärung der sechs bis sieben Größenordnungen kleineren Klebewahrscheinlichkeit besteht in der Annahme, dass nur ein kleiner Bruchteil der Mitglieder des Ausgangsensembles fähig zur Aggregation ist.

Eine ergänzende Perspektive ergibt sich durch das Konzept fluktuierender Sekundärstrukturelemente, die auch Mikrodomänen genannt werden, und ein tragendes Element des Diffusions-Kollisions-Modells der Proteinfaltung bilden [Karplus and Weaver, 1994]. Dieses ist ausführlicher in Anhang C skizziert. Die niedrigen Klebewahrscheinlichkeiten sind ein Zeichen der geringen Wahrscheinlichkeit der Verschmelzung zweier Mikrodomänen, die Bestandteile unterschiedlicher Proteinmoleküle sind. Im Zusammenhang mit der Fehlfaltung repräsentieren Mikrodomänen nicht-native Strukturen, meist kurze β -Faltblattstränge, die durch intermolekulare Kontaktbildung stabilisiert werden. Diese Interpretation ist eine Erweiterung des ursprünglichen Diffusions-Kollisions-Modells auf die Fehlfaltung von Proteinen, die nach gegenwärtigem Kenntnisstand immer mit höheren Aggregationsstufen des

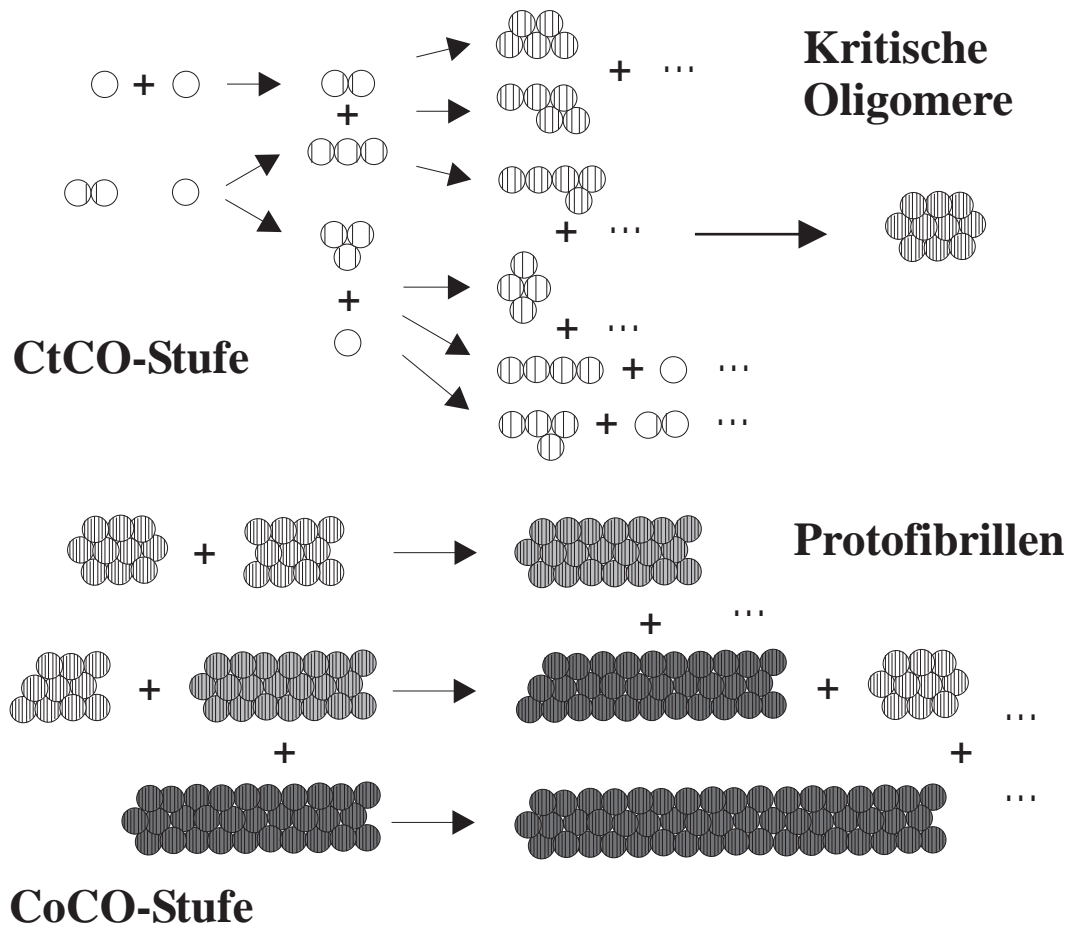


Abbildung 2.14: Verallgemeinertes Diffusions-Kollisions-Modell der Fehlfaltung. Das Modell wurde aus der Beschreibung der Amyloidbildungsreaktion von PGK abgeleitet [Modler et al., 2003]. Kritische Oligomere werden während der ersten Wachstumsphase gebildet, die „Clustern zu kritischen Oligomeren (CtCO)“ genannt wird. Die Kreise stellen Monomere oder monomere Untereinheiten der wachsenden Oligomere dar. Die Zunahme an β -Faltblattsträngen wird durch die wachsende Zahl an Sekanten innerhalb der Kreise während der CtCO-Phase symbolisiert. Es ist nur eine Auswahl der möglichen Reaktionen gemäss der Smoluchowski-Koagulationstheorie gezeigt. Die Anordnungen der Kreise sind schematisch zu verstehen. Sie sollten als Skizze der tatsächlich an den Reaktionen beteiligten Oligomerkonfigurationen aufgefasst werden. Protofibrillen entstehen durch die Vereinigung von kritischen Oligomeren. Dieser zweite Wachstumsprozess heißt „Clustern der kritischen Oligomere (CoCO)“. Dabei ist das weitere Anwachsen von β -faltblattreicher Sekundärstruktur durch die zunehmende Grauschattierung angedeutet. Die Protofibrillen sind zur Vereinfachung gerade gezeichnet. Ihre eigentlich gekrümmte Form kann der elektronenmikroskopischen Aufnahme Abb. 2.3 entnommen werden.

monomeren Proteins verbunden ist. Der entscheidende Punkt ist die Stabilisierung der fehlgefalteten Sekundärstrukturelemente (Mikrodomänen) durch Ausbildung quartärer Kon-

takte. Natürliche β -Faltblattproteine umgehen weitestgehend die Gefahr der quartären Kontaktbildung und intermolekularen Aggregation an den Kanten ihrer β -Stränge durch deren spezielles Design [Richardson and Richardson, 2002].

Kopplung von Wachstum und Konformationskonversion

Die Änderung der Sekundärstruktur nimmt streng monoton mit der Masse der Aggregate zu (s. Abb. 2.9). Schematisch ist das in Abb. 2.14 dadurch angedeutet, dass der β -Faltblattgehalt einer monomeren Untereinheit mit der Anzahl an Untereinheiten innerhalb eines Oligomers zunimmt. Dieses Verhalten stellt eine weitere Stütze der Deutung im Rahmen des dynamischen Bildes der Stabilisierung fehlgefalteter Mikrodomänen durch intermolekulare Vereinigung dar. Da immer mehr Proteinketten in einer vornehmlich β -faltblattreichen Struktur akkumuliert werden, bilden die resultierenden Oligomere eine Kreuz- β -Struktur aus. Oberhalb eines kritischen Schwellenwerts der Masse zieht dieses Verhalten eine strukturelle Polarität der Proteinpartikel nach sich. Weiteres Wachstum vollzieht sich konsequenterweise nur noch durch Verlängerung dieser Strukturen und findet damit linear statt. Sie werden deswegen kritische Oligomere genannt. Ihre Bildungsphase heißt „Clustern zu kritischen Oligomeren (CtCO)“. Der Schwellenwert der Masse, ab dem lineares Wachstum auftritt, beträgt zehn Monomermassen.

Die Sättigung der Konformationskonversion tritt innerhalb der zweiten Wachstumsphase ein, wenn die kritischen Oligomere sich zu kurzen Fibrillen vereinigen. Diese Phase wird deswegen „Clustern der kritischen Oligomere (CoCO)“ genannt. Die Aggregate bestehen dann im Mittel aus etwa dreißig Monomeren. Weiteres Wachstum während dieser Phase findet durch Reaktionen zwischen allen vorhandenen Aggregaten einschließlich der kurzen Fibrillen statt. Ähnliche fibrilläre Aggregate wurden auch bei der Fehlfaltung und Aggregation einer Vielzahl anderer Proteine entdeckt. Sie werden üblicherweise als Protofibrillen bezeichnet [Rochet and Lansbury, 2000].

Das Schema des verallgemeinerten Diffusions-Kollisions-Modells der Fehlfaltung von Proteinen in Abb. 2.14 legt das Auftreten einer Vielzahl struktureller Intermediatzustände nahe. Tatsächlich ergibt die Faktoranalyse der FTIR-Spektren auch drei bis acht intermediäre Zustände, was einer ungewöhnlich hohen Anzahl beteiligter Intermediate entspricht. Die ungenaue Angabe der exakten Anzahl läßt sich durch die spektroskopische Ähnlichkeit der populierten Zustände erklären. Das Schema sagt ja geradezu voraus, dass sich das Spektrum eines Intermediates als Linearkombination anderer Intermediatspektren ausdrücken lassen müsste. In diesem Fall ist aber die exakte Zahl der Faktoren und damit der Intermediate extrem schwierig ableitbar, was sich ja in der relativ ungenauen Angabe der Anzahl an Intermediaten widerspiegelt (s. hierzu Anhang D). Ein weiteres Problem, das die Bestimmung der Faktoren erheblich erschwert, stellt die zu vermutende geringe Population der Intermediate dar. Die exemplarischen Profilverläufe 2.13 demonstrieren überzeugend die Besetzung von mindestens fünf intermediären Zuständen, die während der Amyloidbildungsreaktion zeitweise besetzt werden. Dabei können diese spektroskopisch unterscheidbaren Intermediate natürlich nicht direkt mit einem definierten molekularen Zustand in Verbindung gebracht werden. Sie stellen selbst vielmehr schon ein Mittel über

ein unbekanntes Konformationsensemble von Aggregaten dar, die selbst noch eine gewisse Polydispersität besitzen könnten. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob alle Konformationsumwandlungen tatsächlich bimolekularen Charakter aufweisen. Gegebenenfalls finden Strukturumwandlungen auch durch unimolekulare Reaktionen statt. Bei der konventionellen Faltung monomerer Proteine ist dies ja die einzige Möglichkeit. Die Faltung oligomerer Proteine beinhaltet normalerweise neben den bimolekularen Assoziationschritten auch unimolekulare Reaktionen, durch die nach der unspezifischen Komplexbildung die Tertiärkontakte und die Sekundärstrukturelemente zurechtgerückt werden, um die funktionelle Konformation einzunehmen [Jaenicke and Lilie, 2000]. Zur Beantwortung dieser Frage müssten aber noch mehr Datensätze mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen gemessen werden, um die Unabhängigkeit der Umwandlung eines Zustandes von der Proteinkonzentration wirklich beweisen zu können.

Die letzte Diskussion und die Kopplung des Wachstums mit der internen Strukturumwandlung der gebildeten Aggregate demonstriert den fundamentalen Unterschied zwischen Aggregationsphänomenen von Proteinen und Kolloiden. Letztere zeichnen sich ja gerade dadurch aus, keine unter diesen Bedingungen anregbaren internen Freiheitsgrade zu besitzen. Deshalb kann eine Beschreibung der Aggregationsvorgänge von Proteinen durch Konzepte der Kolloidchemie nur gewissen Aspekten gerecht werden, die sich meist auf die auftretenden Aggregationsstufen und deren Kinetik beschränken.

Zusammenfassend stellt die Amyloidbildung der PGK einen Zweistufenprozess dar, der unter den gegebenen Bedingungen irreversibel ist. Durch den ersten Prozess werden kritische Oligomere gebildet. Diese stellen den Dreh- und Angelpunkt dar, von dem ausgehend Protofibrillen gebildet werden.

3. Zur Fehlfaltung des Prion-Proteins

Die Nur-Eiweiß-Hypothese (Prion-Hypothese) besagt, dass das Prion-Protein (PrP) in seiner sogenannten Scrapie-Form (PrP^{Sc}) den alleinigen Bestandteil des infektiösen Agens darstellt, das die übertragbaren schwammartigen Hirndegenerationen (TSE) auslöst. Das PrP^{Sc} weist gemäß der Prion-Hypothese eine abnormale, oligomere Form des körpereigenen, zellulären Prion-Proteins (PrP^C) auf. Die zentrale Annahme der Prion-Hypothese ist, dass das zelluläre Prion-Protein (PrP^C) in seiner kovalenten Struktur (Konstitution) identisch mit dem krankheitsauslösenden PrP^{Sc} ist. Beide Formen des PrP unterscheiden sich ausschließlich in ihrer dreidimensionalen Struktur (Konformation) [Prusiner, 1982]. Spätere spektroskopische Untersuchungen belegten auch, dass PrP^{Sc} einen höheren Gehalt an β -faltblattreicher Sekundärstruktur aufweist als die körpereigene, zelluläre Isoform PrP^C [Riesner, 2001].

Im ersten Unterkapitel wird das in dieser Arbeit untersuchte Fragment des Prion-Proteins des Syrischen Hamsters (SHaPrP) vorgestellt. Daran schließt sich die biophysikalische Charakterisierung des monomeren Zustandes an. Frühere Studien verschiedener Arbeitsgruppen identifizierten Lösungsmittelbedingungen, unter denen eine Konversion des PrP in β -faltblattreiche Oligomere und Amyloidfibrillen stattfindet [Swietnicki et al., 2000, Morillas et al., 2001, Baskakov et al., 2001, Baskakov et al., 2002, Lu and Chang, 2002]. Diese Fehlfaltungsreaktion wurde einer detaillierteren Untersuchung unterzogen [Sokolowski et al., 2003], deren Ergebnisse im dritten Abschnitt niedergelegt sind. Die daraus ableitbaren Schlüsse für die Bildungsmechanismen der entstehenden Oligomere und Fibrillen sind im darauffolgenden Abschnitt dargestellt. Abschließend werden die Resultate im Zusammenhang mit den offenen Fragen der Prionenforschung diskutiert.

3.1 Das Prion-Protein des Syrischen Hamsters

Die Prion-Proteine der Säugetiere sind hochkonserviert. Paarweises Vergleichen ihrer Aminosäuresequenzen liefert eine Sequenzidentität über 90% [Schätzl et al., 1995]. Bei Sequenzidentitäten über 25% geht man im Allgemeinen von einer identischen globulären Proteinstruktur und folglich von sehr ähnlichen biophysikalischen Eigenschaften aus. Die folgenden Fakten und die aus dieser Studie gewonnenen Einsichten können deshalb als repräsentativ für alle Prion-Proteine der Säugetiere angesehen werden.

Das Prion-Protein des Syrischen Hamsters besteht aus 208 Aminosäuren (Reste 23-231, Numerierung gemäß der menschlichen Sequenz) und ist ein Zelloberflächenprotein. Die auftretenden posttranslationalen Veränderungen sind in Abbildung 3.1 gezeigt. Das

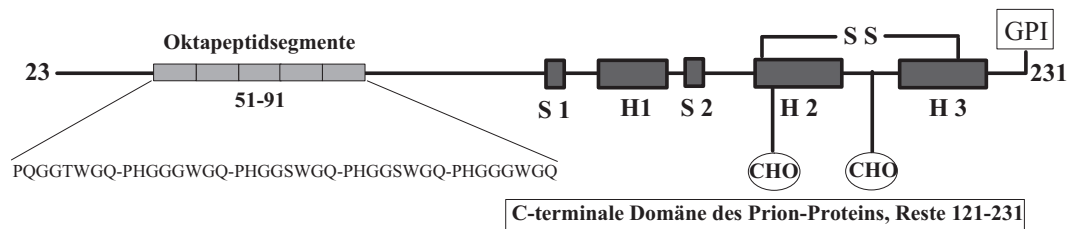


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der posttranslationalen Modifikationen des zellulären Prion-Proteins gemäß Glockshuber [Glockshuber, 2001a]. Das natürliche PrP^C wird an den Resten Asn181 und Asn197 glykosyliert (CHO). Zwischen den einzigen Cysteinresten Cys179 und Cys214 des PrP wird eine Disulfidbrücke (SS) ausgebildet. Am C-terminalen Ser231 wird ein Glykosyl-Phosphatidylinositol(GPI)-Anker angehängt. Nur die C-terminale Domäne (Reste 121-231) besitzt eine gefaltete dreidimensionale Struktur. Sie besteht aus einem zweisträngigen β -Faltblatt(S1,S2) und drei α -Helices (H1-H3) (vgl. Abb. 3.2). Der N-terminale Teil (Reste 23-120) weist keine geordnete dreidimensionale Struktur auf. Er ist hoch flexibel und verhält sich wie ein Zufallsknäuel [Wüthrich and Riek, 2001]. Die fünf sich wiederholenden Oktapeptidsequenzen innerhalb des Segmentes 51-91 sind durch hellgrau unterlegte Rechtecke angedeutet. Sie wurden als selektive Bindungsstellen für Cu²⁺-Ionen identifiziert [Stöckel et al., 1998].

Protein wird über eine Glykosyl-Phosphatidylinositol(GPI)-Einheit in der Zellmembran verankert. Es ist an Asn181 und Asn197 glykosyliert und enthält eine Disulfidbrücke zwischen Cys179 und Cys214, die essentiell für die Stabilität seiner dreidimensionalen Struktur ist [Glockshuber, 2001a].

Die N-terminale Domäne mit den Resten 23-120 bildet einen flexiblen Schwanz, der unstrukturiert und damit im Vergleich zu den bekannten Proteinstrukturen ein ungewöhnliches Merkmal ist [Wüthrich and Riek, 2001]. In Abbildung 3.2 ist die dreidimensionale Struktur des Fragmentes, das die Reste 90-231 des Prion-Proteins des Syrischen Hamster SHaPrP(90-231) umfasst, gezeigt [Liu et al., 1999]. Der Abschnitt 90-120 ist wie beim Protein mit der vollen Länge unstrukturiert. Das Fragment PrP(90-231) besitzt eine besondere Bedeutung. PrP^{Sc} ist im Gegensatz zu PrP^C teilweise resistent gegen den Abbau mit Proteasen. Die Verdauung von PrP^{Sc} mit Proteinase K (PK) hinterläßt eine einheitliche, N-terminal beschnittene Form, die PrP(27-30) genannt wird. PrP(27-30) behält die Infektiosität bei und umschließt die Sequenz mit den Resten 90-231. Das ist ein starker Hinweis darauf, dass PrP^{Sc} ein geordnetes Oligomer ist, indem die Untereinheiten äquivalente Plätze einnehmen. Der Schutz des Segmentes 90-120 vor Degradierung mit PK deutet auf dessen Strukturierung in PrP^{Sc} hin. PrP(90-231) ist aufgrund der angeführten Fakten die minimale Sequenz, die zur Erzeugung von Infektiosität nötig ist. Die Disulfidbrücke ist in PrP^{Sc} im oxidierten Zustand und damit intakt. Das schließt aber eine vorläufige Auflösung und Wiederausbildung der Disulfidbrücke während der Entstehung von PrP^{Sc} nicht aus [Glockshuber, 2001b]. Die normale Funktion von PrP^C ist bisher unbekannt.

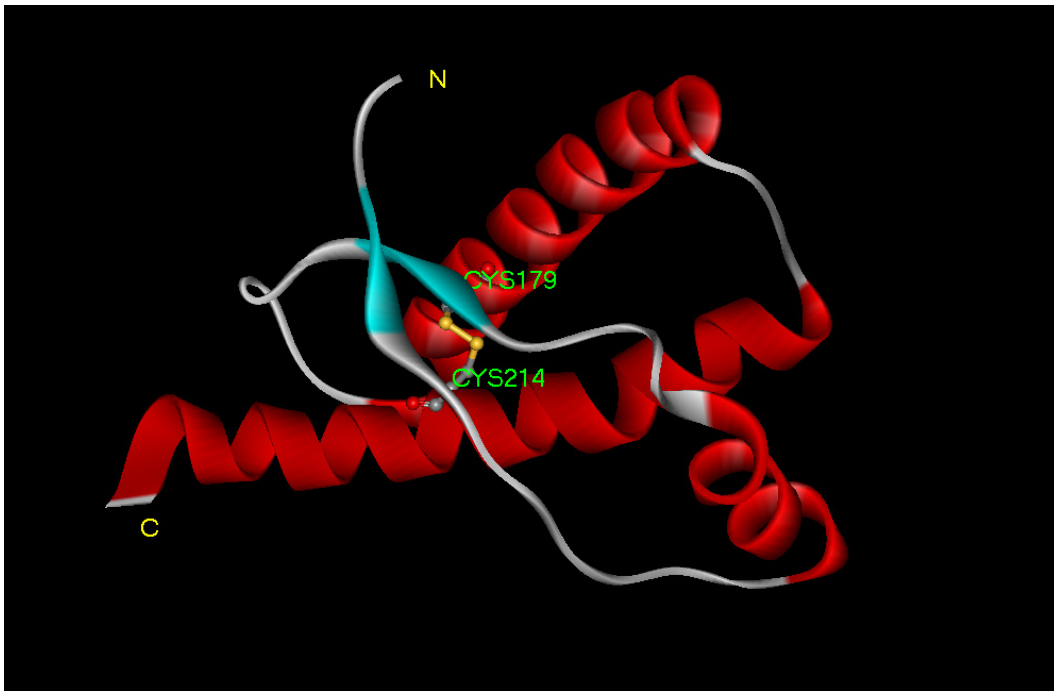


Abbildung 3.2: Dreidimensionale Struktur des SHaPrP(90-231) [Liu et al., 1999]. Das N-terminale Ende des dargestellten Fragments ist durch den Rest Leucin125 gegeben. Der N-Terminus (Reste 90-124) ist unstrukturiert und besitzt daher keine definierte Raumstruktur, die visualisiert werden könnte. Die beiden β -Stränge, bestehend aus den Resten 129-131 und 161-163, formen ein antiparalleles β -Faltblatt (blau eingefärbte Bereiche). Die Segmente aus den Resten 144-154, 172-193 und 200-227 bilden jeweils α -Helices aus (rot).

Der endgültige Beweis der Prionen-Hypothese steht noch aus. Zahlreiche Versuche einer Vielzahl von Forschungsgruppen, eine Konversion von natürlichem oder rekombinantem PrP^C in PrP^{Sc} in vitro herbeizuführen, sind bisher erfolglos verlaufen [Glockshuber, 2001b].

3.2 Ausgangszustand

Das CD-Spektrum von SHaPrP(90-232) weist erwartungsgemäß bei pH 7.0 die typischen Minima für α -Helices bei 208 nm und 222 nm auf (Abb. 3.3). Das Gen des PrP codiert ursprünglich für 250 Aminosäuren. Die 22 N-terminalen und die 19 C-terminalen Aminosäuren dienen als Signalpeptide, die abgespalten werden [Schätzl et al., 1995]. Die Sequenz des SHaPrP(90-232) besitzt im Gegensatz zu der in Abb. 3.2 dargestellten Struktur des SHaPrP(90-231) noch den Rest 232, der unter zellulären Bedingungen abgetrennt wird.

Absenkung des pHs auf pH 4.2 hat praktisch keine Auswirkungen auf das CD-Spektrum (vgl. Kurve 2 Abb. 3.3). Nach einem GuHCl-Konzentrationsprung von 0 nach 1 M

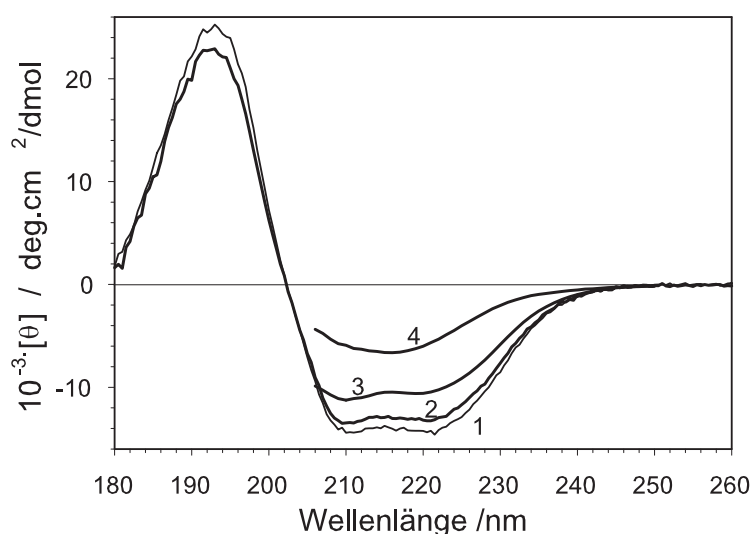


Abbildung 3.3: CD-Spektren des SHaPrP(90-232) unter verschiedenen Bedingungen. (1) Nativ gefalteter Zustand in 20 mM NaH_2PO_4 -Puffer bei pH 7.0 mit $c = 1.13$ g/l. (2) 20 mM Natriumacetat, pH 4.2, 50 mM NaCl, $c = 1.19$ g/l. (3) 1 min und (4) 116 h nach Zugabe von GuHCl (1 M Endkonzentration) zu 20 mM Natriumacetat, pH 4.2, 50 mM NaCl, $c = 0.27$ g/l. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur ($T = 23^\circ\text{C}$) unter Verwendung von 0.1 mm (Kurven 1 und 2) bzw. 1 mm Zellen (Kurven 3 und 4) durchgeführt. Aufgrund der starken Absorption von GuHCl konnten die Spektren 3 und 4 nur bis zu Wellenlängen oberhalb von 207 nm vermessen werden.

bei pH 4.2 änderte sich das CD-Spektrum mit stark konzentrationsabhängiger Rate. Diese Bedingungen entsprechen den eingangs erwähnten Lösungsmittelbedingungen, unter denen eine Konversion des Prion-Proteins in β -faltblattreiche Aggregate stattfindet [Swietnicki et al., 2000, Morillas et al., 2001, Baskakov et al., 2001, Baskakov et al., 2002, Lu and Chang, 2002]. Kurve 4 in Abb. 3.3 zeigt das CD-Spektrum nach 116 Stunden, das typisch für ein β -faltblattreiches Protein ist. Zum Studium der Fehlfaltungsreaktion des PrP ist es wesentlich, ob dieser α -nach- β -Übergang sich schon im monomeren PrP vollzieht oder mit der nachgewiesenen Aggregation des Proteins gekoppelt ist (s. später). In Abb. 3.3 ist deshalb das erste CD-Spektrum gezeigt, das nach einer Minute nach Mischung mit GuHCl bei einer niedrigen Proteinkonzentration (0.27 g/l) gemessen wurde (Kurve 3). Zu diesem Zeitpunkt ist der Einfluss der Aggregation vernachlässigbar. Das Protein ist im monomeren Zustand, was durch Größenausschlusschromatographie (abk. SEC vom engl. size exclusion chromatography) bestätigt wurde. Das Spektrum unterscheidet sich deutlich vom Spektrum in Abwesenheit von GuHCl und jenem nach Ende der Konversion. Die Form des Spektrums ist jedoch sehr ähnlich zum anfänglich helikalen Zustand. Durch SLS und DLS wurden das Molekulargewicht und der hydrodynamische Radius der stabilen Zustände von SHaPrP(90-232) in Abwesenheit von GuHCl bestimmt (Abb. 3.4). Bei pH 7.0 bestanden die Größenverteilungen, die durch das Programm CONTIN aus den DLS-Daten gewonnen

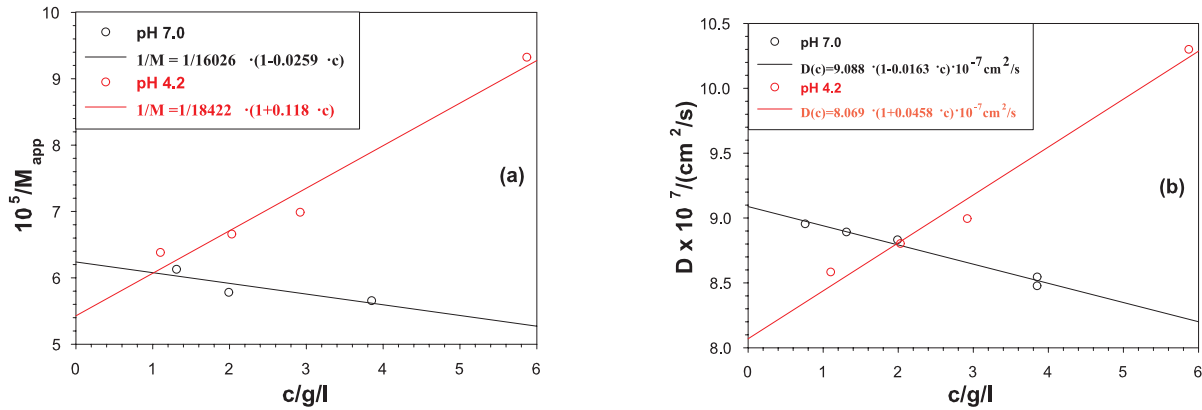


Abbildung 3.4: Lichtstreuung an SHaPrP(90-232). (a) SLS (b) DLS. Lösungsmittelbedingungen entsprechen jenen von Abb. 3.3 in Abwesenheit von GuHCl. Schwarz: pH 7.0, Rot: pH 4.2.

wurden (vgl. Anhang A), nur aus einem Peak. Dieser konnte dem monomeren Zustand bei pH 7.0 zugeordnet werden. Im Gegensatz dazu umfasste die Verteilung bei pH 4.2 zwei Peaks, wobei der zusätzliche und kleinere Peak aufgrund der Anwesenheit kleinerer Mengen aggregierten Materials zustandekommt. Das Verhältnis der Peakflächen wurde benutzt, um die Beiträge der Monomere und Aggregate zur Intensität der SLS-Messungen abzutrennen. Extrapolation zu verschwindender Proteinkonzentration ergab Molekulargewichte M von $16\,000 \pm 2\,000$ g/mol und $18\,000 \pm 2\,000$ g/mol in pH 7 bzw. pH 4.2 (s. Abb. 3.4). Beide Werte stimmen innerhalb der Fehlergrenzen mit dem theoretischen Wert des monomeren SHaPrP(90-232) überein. Aus den extrapolierten Diffusionskoeffizienten errechneten sich die hydrodynamischen Radien R_S zu 2.36 ± 0.04 nm in pH 7 und 2.66 ± 0.05 nm in pH 4.2 (s. Abb. 3.4). Die PrP-Moleküle sind also im leicht sauren Milieu (pH 4.2) weniger kompakt als bei neutralem pH. Die erhaltenen Werte für M und R_S bei pH 4.2 in Abwesenheit von GuHCl wurden als Referenzwerte für die relativen Zunahmen beider Größen (M_{rel} und R_{rel}) während der Fehlfaltungsreaktion benutzt.

3.3 Fehlfaltungsreaktion

Die Fehlfaltungsreaktion des SHaPrP(90-232), die durch den GuHCl-Konzentrationsprung von 0 nach 1 M bei pH 4.2 und entsprechend hoher Ionenstärke ausgelöst wird, soll hier aus der Perspektive der jeweils verwendeten Methode näher beleuchtet. Im Anschluss an die Vorstellung der kinetischen Daten wird den Produkten der Fehlfaltungsreaktion auf den Grund gegangen. Es stellt sich nämlich heraus, dass verschiedene Produkte entstehen, deren Relation zueinander einer Klärung bedarf.

3.3.1 Kinetik

Chromatographie

Die Fehlfaltungsreaktion des SHaPrP(90-232) wurde mit SEC verfolgt. Dazu wurden Aliquote der gleichen Stammlösung zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen und auf einer Superose-12HR30-Säule von Pharmacia (Uppsala, Schweden) aufgetragen. Überra-

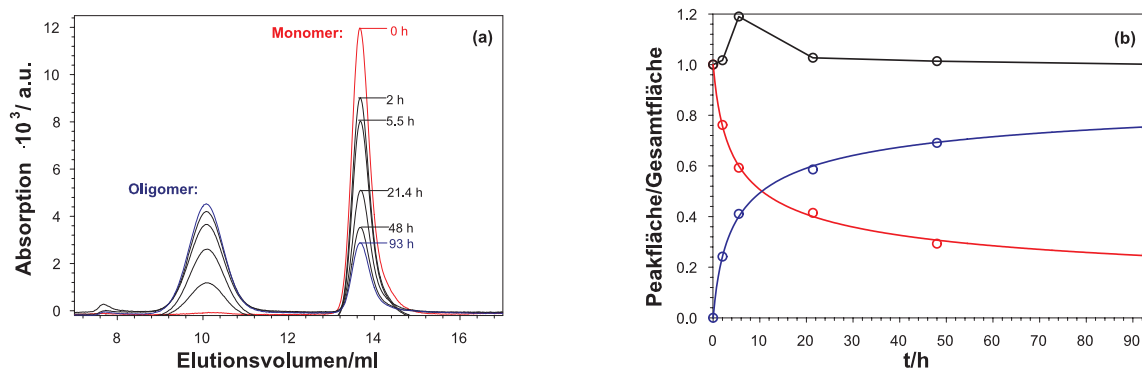


Abbildung 3.5: Größenausschlusschromatographie von SHaPrP(90-232) bei pH 4.2 in 20 mM Natriumacetat, 50 mM NaCl, 1 M GuHCl, $T = 23^\circ\text{C}$, $c = 0.078\text{ g/l}$. (a) Chromatogramme (b) Zeitverlauf der integrierten Peakflächen: (○) Monomer, (○) Oligomer, (○) $A(t)/A(0)$ wobei A die Gesamtfläche des Chromatogramms ist.

schenderweise treten nur zwei definierte Peaks auf (Abb. 3.5 (a)). Der abnehmende Peak beim Elutionsvolumen von 13.6 ml stellt die während der Reaktion verbrauchten Monomere dar. Die gebildeten Produkte sammeln sich alle in einem Oligomerpeak, der erstaunlich definiert und symmetrisch ist. Es sind für keinen Zeitpunkt intermediäre Peaks nachweisbar. Konsequenterweise lassen sich die Zeitverläufe der integrierten Peakflächen durch die Gleichung für eine irreversible Zweizustandsreaktion n-ter Ordnung anpassen

$$n A \xrightarrow{k} A_n \quad :$$

$$c_{\text{Edukt}}(t) = \frac{c(0)}{(1 + (n-1) \cdot c(0)^{n-1} \cdot k \cdot t)^{\frac{1}{n-1}}} \quad (3.1)$$

$$c_{\text{Produkt}}(t) = c(0) \left[1 - \frac{1}{(1 + (n-1) \cdot c(0)^{n-1} \cdot k \cdot t)^{\frac{1}{n-1}}} \right] \quad (3.2)$$

Die Anpassung ist sehr gut (Korrelationskoeffizient $r^2 = 0.9988$). Der Verlauf der auf die Gesamtfläche des ersten Chromatogramms normierten Gesamtflächen ist konstant (abgesehen von der 20%-ige Abweichung beim dritten Messwert). Aus der Anpassung ergibt sich eine augenscheinliche Reaktionsordnung von $n = 3.9$ und eine Ratenkonstante von $k = 0.56\text{ h}^{-1}$.

FTIR-Spektroskopie

In Abbildung 3.6 (a) ist ein Ausschnitt aus dem Wellenzahlenbereich von $1200 - 1900 \text{ cm}^{-1}$ gezeigt, der zur Aufnahme der spektralen Veränderungen während der Fehlfaltungsreaktion herangezogen wurde. Die Hauptereignisse sind ein Verlust an α -helikaler Struktur, der durch die Abnahme der Bande bei 1653 cm^{-1} angezeigt wird, sowie die Zunahme β -faltblattreicher Strukturen, die durch das Anwachsen der Banden bei 1621 cm^{-1} und 1691 cm^{-1} belegt werden. Die Faktoranalyse der Zeitreihe der FTIR-Differenzspektren er-

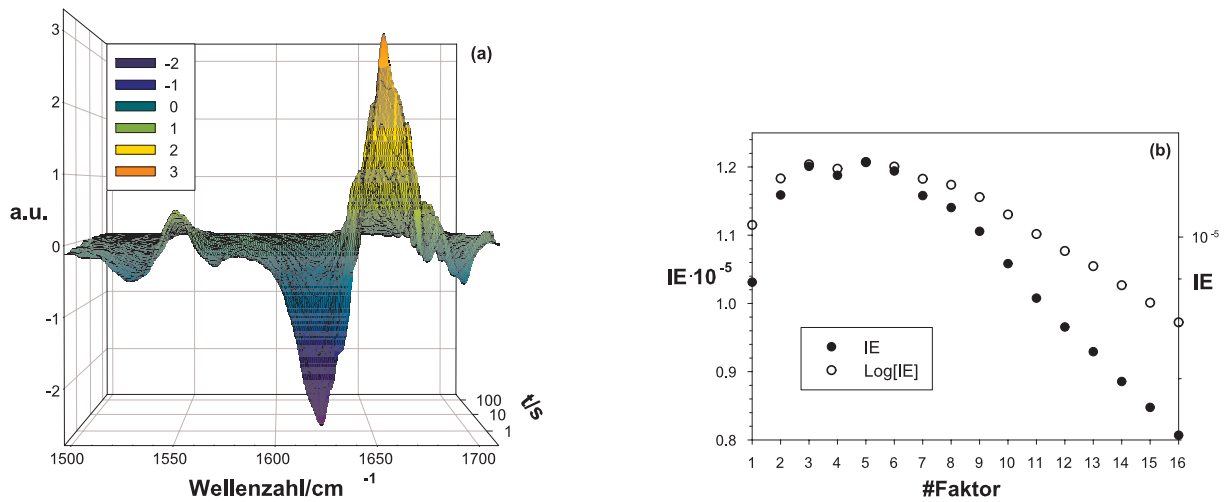


Abbildung 3.6: Kinetik der α - β -Konversion von SHaPrP(90-232) aufgezeichnet mit FTIR-Spektroskopie. (a) Differenzspektren, die durch Abzug des letzten Spektrums von jedem einzelnen Spektrum erhalten wurden, nach Mischung mit GuHCl zu einer Endkonzentration von 1 M gepuffert durch 20 mM Natriumacetat bei pH 4.2. (b) Die eingebettete Fehlerfunktion nimmt ihr Minimum beim ersten Singulärwert an. Die Konversion erfolgt demnach gemäß einer Zweizustandsreaktion ohne auftretende Intermediate (vgl. Anhang D).

gab nur eine signifikante Komponente (s. Abb. 3.6 (b) und Anhang D). Die Untersuchung der Absolutspektren ist in Anhang D weiter ausgeführt. Die durch FTIR-Spektroskopie beobachtete α - β -Konversion verhält sich also ebenfalls wie eine Zweizustandsreaktion. Es reicht demzufolge aus, den Verlauf einzelner Banden zu beschreiben. In Abbildung 3.7 (a) ist die Anpassung einer irreversiblen bimolekularen Reaktion gemäß Gleichung 3.3 an den Zeitverlauf der Bande bei $k = 1621 \text{ cm}^{-1}$ gezeigt.

$$A(t) = A(0) \left(1 - \frac{1}{1 + t/\tau} \right) \Leftrightarrow \frac{A(t) - A(0)}{t} = -\frac{A(t)}{\tau} + \frac{A(0)}{\tau} \quad (3.3)$$

Die Anpassungsparameter ergaben sich zu $\tau = 2.42 \text{ s}$ und $A(0) = 0.0026$ bei einem Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0.989$. Selbstverständlich ist Gl. 3.3 äquivalent zum allgemeinen Ausdruck Gl. 3.2 mit $n = 2$.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, $(A(t) - A(0))/t$ gegen $A(t)$ aufzutragen. Für den Verlauf einer bimolekularen Reaktion muss sich ein linearer Verlauf ergeben, wie aus der

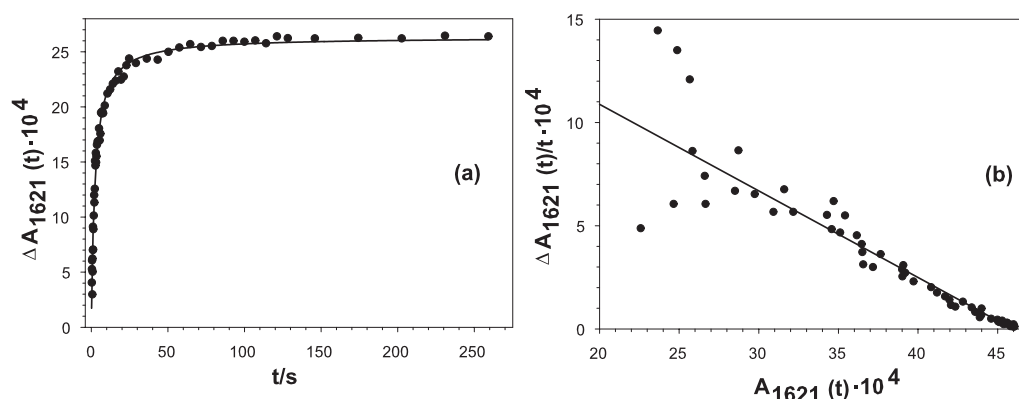


Abbildung 3.7: Zeitverlauf der Änderungen bei $k = 1621\text{cm}^{-1}$. Diese Wellenzahl ist diagnostisch für auftretende β -Faltblattstrukturen. (a) Normale Darstellung. Die durchgezogene Linie stellt die Anpassung einer irreversiblen bimolekularen Reaktion dar (Gl. 3.2 mit $n=2$). (b) Reskalierte Darstellung, um die Reaktionsordnung des Prozesses direkt ablesen zu können (nach Mauser [Mauser, 1974]).

Äquivalenz des Ausdrucks zum ursprünglichen Zeitverlauf einer Reaktion zweiter Ordnung hervorgeht (vgl. Gl. 3.3). Der Kurvenverlauf von Reaktionen erster und höherer Ordnung weist im Gegensatz dazu deutliche Krümmungen auf. Sie sind damit leicht vom linearen Verhalten der zweiten Ordnungsreaktion zu unterscheiden [Mauser, 1974]. Die Darstellung Abb. 3.7 (b) bestätigt also den Zeitverlauf gemäß einer Reaktion zweiter Ordnung für die α - β -Konversion bei der Fehlfaltung des SHaPrP(90-232).

Cirkulardichroismus

Es wurden ganze CD-Spektren im Wellenlängenbereich von 207 nm bis 260 nm während der Fehlfaltungsreaktion von SHaPrP(90-232) aufgenommen. Die minimale Zeitauflösung zwischen zwei aufeinanderfolgenden Spektren betrug ungefähr 50 s. Faktoranalyse der Absolutspektren ergab nur zwei wesentliche Faktoren (s. Anhang D). Es handelt sich aus CD-spektroskopischer Sicht um eine Zweizustandsreaktion. Das Produkt wird ohne spektroskopisch nachweisbare Intermediate direkt aus dem Edukt gebildet, was das Ergebnis der Analyse der FTIR-Daten bestätigt. Die weitere Betrachtung beschränkt sich deshalb auf die Untersuchung des Zeitverlaufs der Elliptizität $[\theta]$ bei 215 nm, die charakteristisch für die Ausbildung β -faltblattreicher Sekundärstrukturbestandteile ist.

Die in Abbildung 3.8 (a) gezeigte Auftragung erfolgte gemäß der bereits in Gl. 3.3 eingeführten reskalierten Darstellung. Alle Kurven weisen fast über den ganzen Wertebereich ein lineares Verhalten auf. Die Abweichungen im Anfangsbereich werden entweder durch die Unsicherheit der genauen Kenntnis des Startzeitpunktes der Reaktion verursacht, die aufgrund des manuellen Mischens des Reaktionsgemisches entsteht, oder sind Ausdruck ei-

ner komplexen Reaktion (vgl. Anhang E). Die Zeitverläufe der Strukturkonversion deuten im Einklang mit dem Befund der FTIR-Spektroskopie auf eine Reaktion zweiter Ordnung hin.

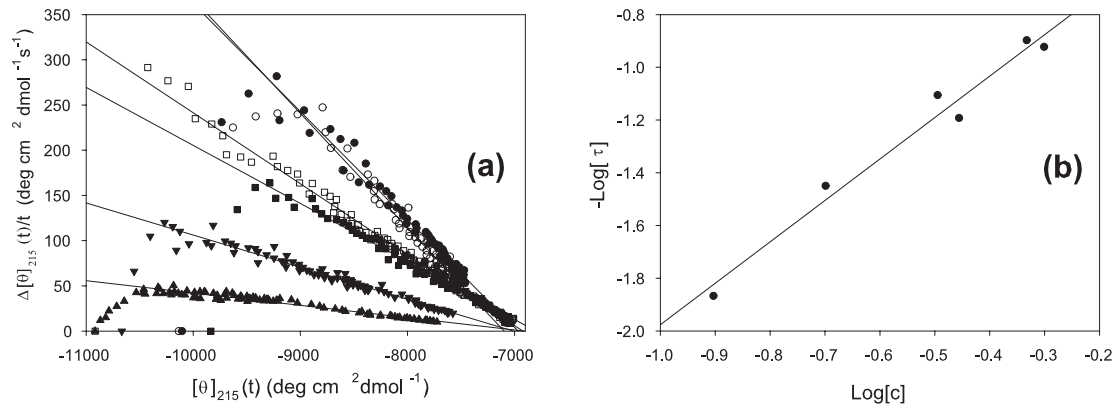


Abbildung 3.8: (a) Kinetiken der Sekundärstrukturumwandlung aufgenommen bei einer Elliptizität $[\theta]$ von 215 nm für Proteinkonzentrationen an SHaPrP(90-232) von 0.125 g/l (▲), 0.2 g/l (▼), 0.32 g/l (□), 0.35 g/l (■), 0.47 g/l (○) und 0.50 g/l (●) in 20 mM Natriumacetat, pH 4.2, 50 mM NaCl, 1 M GuHCl bei $T = 23^\circ\text{C}$. (b) Konzentrationsabhängigkeit der apparenten Raten τ^{-1} , die von den Steigungen der jeweiligen Ausgleichsgeraden aus (a) berechnet wurden.

Die Steigungen m der Ausgleichsgeraden an die Kurven in Abb. 3.8 (a) sind über der Proteinkonzentration der jeweiligen Kurve in Abb. 3.8 (b) eingezeichnet. Der Koeffizientenvergleich mit Gl. 3.3 ergibt, dass $m = -\tau^{-1}$ ist. Allgemein folgt aus Gl. 3.2 eine Konzentrationsabhängigkeit der charakteristischen Zeit τ der Form $\tau^{-1} \propto c^{n-1}$. Für $n = 2$ folgt also $\tau^{-1} \propto c$. Lineare Regression an die doppeltlogarithmierten Daten in Abb. 3.8 (b) ergibt den Wert 1.6 ± 0.3 und führt damit auf eine Reaktionsordnung von $n = 2.6 \pm 0.3$, was inkonsistent mit der Annahme einer reinen bimolekularen Zweizustandsreaktion ist. Dieser Befund ist ein klarer Hinweis auf einen komplizierteren Mechanismus, der für die Strukturumwandlung von SHaPrP(90-232) verantwortlich ist. Er muss mindestens aus zwei Reaktionsschritten zusammengesetzt sein (vgl. Anhang E).

Lichtstreuung

Der Zeitverlauf der Aggregation des SHaPrP(90-232) nach Hinzufügen von GuHCl durch manuelles Mischen wurde mit SLS und DLS bei $T = 20^\circ\text{C}$ beobachtet. Die Zunahme der relativen molaren Masse M_{rel} ist für drei ausgewählte Proteinkonzentrationen in Abb. 3.9 (a) gezeigt. Die starke Konzentrationsabhängigkeit der Raten ist deutlich sichtbar. Die höchste Proteinkonzentration entspricht in etwa den verwendeten Konzentrationen bei den FTIR-Experimenten. Die Aggregation oberhalb von 2 g/l war jedoch so schnell, dass sie

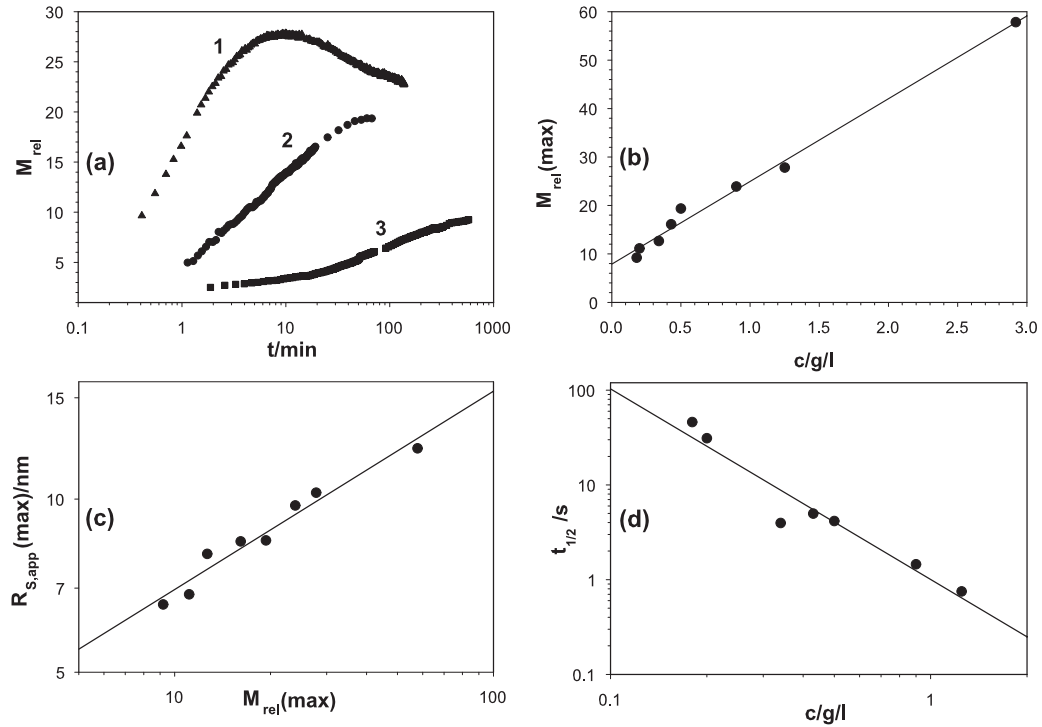


Abbildung 3.9: (a) Anfänglicher Aggregationsschritt von SHaPrP(90-232) bestimmt durch die Zunahme der relativen Masse M_{rel} nach Mischung mit GuHCl (Endkonzentration 1 M) dargestellt für ausgewählte Proteinkonzentrationen von 1.25 g/l (1), 0.50 g/l (2) und 0.20 g/l (3) in 20 mM Natriumacetat, pH 4.2, 50 mM NaCl, $T = 20^\circ C$. (b) Konzentrationsabhängigkeit des vorübergehenden Maximums der relativen Masse. (c) Doppellogarithmische Auftragung der Beziehung zwischen den vorübergehenden Maxima des Stokes-Radius und der relativen Masse. Die Anpassung liefert eine Steigung von $1/d = 0.345$. (d) Konzentrationsabhängigkeit der Halbwertszeit $t_{1/2}$ der Änderungen der relativen Masse.

nicht durch manuelle Mischtechniken erfassbar war. Das vorübergehende Maximum der mittleren Masse der gebildeten Oligomere hängt linear von der Proteinkonzentration ab. Extrapolation des vorübergehenden Überschusses von M_{rel} zu verschwindenden Proteinkonzentrationen ergab eine relative Masse von 7.9 ± 1.0 Monomermassen (Abb. 3.9 (b)). Die dazugehörigen Stokes-Radien der Oligomere lagen zwischen 6.6 nm und 12.3 nm. Die doppeltlogarithmische Auftragung der Maxima der Stokes-Radien über den Maxima der entsprechenden relativen Massen gestattet Aussagen über die Kompaktheit der Oligomere mit dem Massenskalengesetz Gl. 2.3. Es ergibt sich ein Exponent von 0.345 aus Abb. 3.9 (c), was einer Dimensionalität d des Wachstums von 2.9 entspricht. Dreidimensionales Wachstum durch dichtes Aneinanderpacken der Grundbausteine führt auf $d = 3$. Der Wert der Oligomere kommt dieser Obergrenze sehr nahe.

Die Halbwertszeit, die beim Erreichen der Hälfte des Wertes des transienten Maximums verstrichen ist, ist über der Konzentration in Abb. 3.9 (d) in doppeltlogarithmischer Weise dargestellt. Die Steigung der Ausgleichsgeraden beträgt 2.0, woraus eine Reaktionsordnung von $n = 3.0$ folgt.

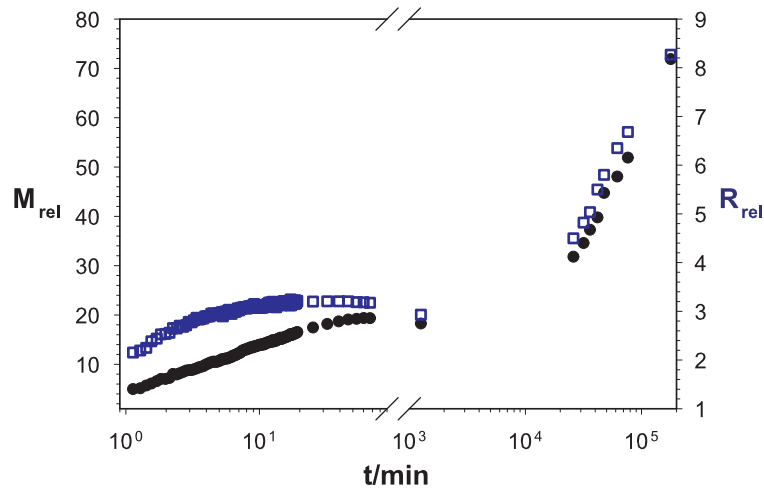


Abbildung 3.10: Übersicht über alle Aggregationsschritte von SHaPrP(90-232) aus der Perspektive der statischen (●) und der dynamischen (□) Lichtstreuung. Die Proteinkonzentration betrug 0.50 g/l bei den sonst identischen Bedingungen wie in Abb. 3.9 (a). Tatsächlich entspringt Kurve (2) aus Abb. 3.9 (a) derselben Messung, wie die in dieser Abbildung präsentierten Daten. M_{rel} und R_{rel} wurden auf die Werte des nativähnlichen Zustandes bei pH 4.2 in der Abwesenheit von GuHCl normiert.

Während der Aufbewahrung der Proben über sehr viel längere Zeiträume wurde eine zweite Wachstumsphase entdeckt, bei der ein deutliches Anwachsen der relativen Masse M_{rel} und des relativen Stokes-Radius R_{rel} beobachtet wird, wie aus Abb. 3.10 zu entnehmen ist. Außerdem ist aus Abb. 3.10 ersichtlich, dass der teilweise Abbau des vorübergehenden Maximums sehr viel längere Zeiträume beansprucht als dessen Bildung. Es liegt die Vermutung nahe, dass durch diesen Prozess erst die Bausteine geformt werden, die während der zweiten Wachstumsphase verbraucht werden.

3.3.2 Endzustände

Die Morphologie der wachsenden Partikel wurde mittels Elektronenmikroskopie bestimmt. Dazu wurden kleine Mengen des Probenmaterials 25 Tage (3.6×10^4 min) und 55 Tage (7.9×10^4 min) nach Initiierung der Fehlfaltungsreaktion von SHaPrP(90-232) entnommen und entsprechend aufgearbeitet. Die Situation nach 25 Tagen (Abb. 3.11 (A)) entspricht dem dritten Messwert zu Beginn der zweiten Aggregationsstufe in Abb. 3.10. Es sind vier verschiedene Partikelmorphologien zu erkennen:

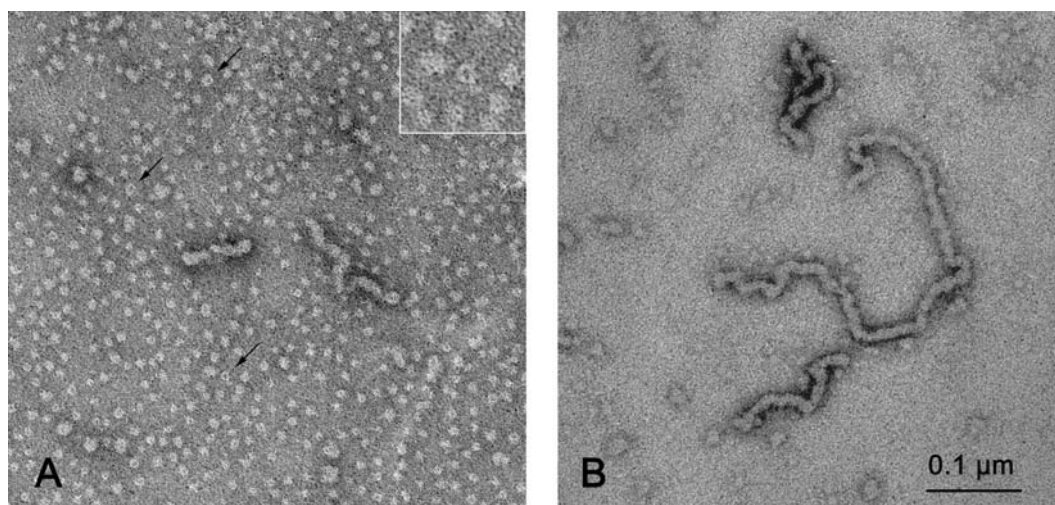


Abbildung 3.11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von aggregierten SHaPrP(90-232) mit $c = 0.50$ g/l inkubiert in 20 mM Natriumacetat, pH 4.2, 50 mM NaCl, 1 M GuHCl nach 25 Tagen (3.6×10^4 min) (A) und 55 Tagen (7.9×10^4 min) (B). Die Proben wurden vor dem Anfärben 25-fach verdünnt. Ringförmige Strukturen werden häufig unter den kleineren, oligomeren Gebilden beobachtet. Drei ausgewählte Ringformen sind mit Pfeilen markiert. Die unterste ist mit höherer Vergrößerung im Teilbild A rechts oben gezeigt. Die späte Aggregationstufe zeichnet sich durch die zunehmende Länge der protofibrillären Strukturen aus.

1. kleine kompakte sphärische Oligomere mit Durchmessern von 10 – 15 nm,
2. kleine ringförmige Oligomere mit Durchmessern von 10 – 15 nm,
3. größere oligomere Klumpen, deren Durchmesser ganzzahlige Vielfache der Durchmesser der kleinen Oligomere sind,
4. vereinzelt kurze Protofibrillen mit einem Durchmesser von 10 – 20 nm.

Aus Abb. 3.11 (B) ist zu erkennen, dass der weitere Anstieg von M_{rel} und R_{rel} während des zweiten Prozesses (vgl. Abb. 3.10) durch das Längenwachstums der Protofibrillen verursacht wird.

3.4 Reaktionsmechanismus

Die SEC, die spektroskopischen Methoden (CD und FTIR) und die Lichtstreuungsmethoden detektieren jeweils unterschiedliche kinetische Phasen der Fehlfaltungsreaktion von SHaPrP(90-232). Am deutlichsten tritt dies durch die aus der jeweiligen Methode abgeleiteten apparenten Reaktionsordnung zu Tage (s. Tab. 3.1). Die im letzten Abschnitt beschriebenen unterschiedlichen oligomeren Strukturen werfen jedoch zunächst die Frage auf, ob der Produktzustand, dessen Erreichen durch die jeweilige Methode beobachtet

Methode	n aus Anpassung	n aus $\tau^{-1} \propto c^{n-1}$	Zweizustandsverhalten
SEC	3.9	-	ja
CD	2	2.6 ± 0.3	ja
FTIR	2	-	ja
SLS	-	3	-

Tabelle 3.1: Merkmale der Fehlfaltungsreaktion von SHaPrP(90-232) aus der Perspektive der verwendeten Methoden. Die apparente Reaktionsordnung n wurde entweder durch Anpassung von Gl. 3.2 an die Kurvenverläufe gewonnen (erste Spalte), oder durch konzentrationsabhängige Messungen, bei der die Abhängigkeit einer charakteristischen Zeit τ von der eingesetzten Proteinkonzentration bestimmt werden konnte (mittlere Spalte). Das Zweizustandsverhalten wurde bei den spektroskopischen Methoden durch Faktoranalyse sichergestellt. Im Falle der SEC ist es direkt an den Chromatogrammen ablesbar (s. Abb. 3.5).

wird, tatsächlich immer der gleiche ist. Anderenfalls wären die unterschiedlichen Phasen nur Ausdruck der Bildung unterschiedlicher Endprodukte. Dieser Erklärungsversuch kann allerdings klar verneint werden, da alle Methoden bei den niedrigsten eingesetzten Ausgangskonzentrationen ($c \leq 0.2$ g/l) aufeinander abgeglichen werden können. In diesem Fall spielt das Überschussphänomen praktisch keine Rolle und es werden gemäß der SEC sehr einheitliche Oligomere gebildet. Aus der Extrapolation der Überschussmasse (Abb. 3.9 (b)) zu verschwindender Proteinkonzentration kann auf ein Oktamer geschlossen werden. Da die Kurvenverläufe und Spektrenscharen beider spektroskopischen Methoden bei allen Konzentrationen dieselbe funktionale Form und das identische Zweizustandsverhalten aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass die α - β -Konversion mit der Bildung des Oktamers abgeschlossen ist.

3.4.1 Sekundärstrukturkonversion

FTIR-Experimente benötigen unter den gegebenen Lösungsmittelbedingungen (H_2O , 1 M GuHCl) Proteinkonzentrationen von mehr als 2 – 3 g/l. Die FTIR-Spektroskopie musste deshalb mit der CD-Spektroskopie kombiniert werden, um Sekundärstrukturänderungen bis zu niedrigen Proteinkonzentrationen von 0.1 g/l nachweisen zu können. Der Wellenlängenbereich der CD-Messungen war eingeschränkt, da die hohe Absorption von GuHCl unterhalb von 207 nm keine Detektion des CD-Effektes mehr gestattet.

Die Aufklärung der mittleren Startkonformation zu Beginn der Strukturumwandlung nach erfolgtem Transfer zu den optimalen Reaktionsbedingungen ist ein wesentlicher Teilaspekt der gesamten Fehlfaltungsreaktion. Beide spektroskopischen Methoden demonstrierten im Einklang miteinander, dass das Absenken des pHs von 7.0 auf 4.2 keinen bedeutenden Einfluss auf die Sekundärstruktur hat. Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen überein [Jackson et al., 1999, Swietnicki et al., 1997]. Die kritische Bewertung der Geschehnisse während der Totzeit nach Beginn der Fehlfaltungsreaktion erlaubt den Schluss, dass keine β -Struktur in dieser Zeitspanne gebildet wird. Es findet aber

ein nachweisbarer Verlust an α -helikaler Struktur statt, wie dem ersten CD-Spektrum nach einer Minute anzusehen ist (s. Abb. 3.3).

Auf den verfügbaren Zeitskalen innerhalb der Spektralbereiche der benutzten Methoden erfolgt die Sekundärstrukturumwandlung gemäß eines Zweizustandsübergangs, was durch Faktoranalyse belegt wurde. Die Zeitverläufe der Signale entsprechen den Kurven, die für eine Reaktion zweiter Ordnung erwartet wird. Die Konzentrationsabhängigkeit der Rate τ^{-1} des CDs ergibt jedoch eine höhere Reaktionsordnung von 2.6 ± 0.3 . Die Strukturkonversion muss also aus mindestens zwei Reaktionsschritten bestehen, um diese kinetischen Merkmale aufweisen zu können. Der dann obligatorische Intermediatzustand muss jedoch so schwach besetzt oder spektral sehr ähnlich zum Edukt bzw. Produkt sein, dass er mit faktoranalytischen Techniken nicht mehr nachweisbar ist (vgl. Anhang D).

3.4.2 Aggregationsprozess

Der Aggregationsprozess, der die Strukturumwandlung begleitete, wurde mit SLS und DLS bei Proteinkonzentrationen zwischen 0.2-2.9 g/l studiert. Bei der höchsten Konzentration, die vergleichbar zu den eingesetzten Proteinmengen bei den FTIR-Messungen (4 g/l) ist, war die Aggregation innerhalb der Totzeit des SLS/DLS-Experimentes im Wesentlichen abgeschlossen. Einen direkten Vergleich mit der LS erlaubte, wie bereits erwähnt, die CD-Spektroskopie bei niedrigen Proteinkonzentrationen. Zu einem besseren Verständnis der zugrundeliegenden Vorgänge trug die Elektronenmikroskopie bei. Durch sie ist eine genaue Bestimmung der auftretenden Morphologien zu bestimmten Zeitpunkten nach Einsetzen der Fehlfaltungsreaktion möglich. Die Aggregationsprozesse während der Fehlfaltungsreaktion von SHaPrP(90-232) offenbarten mehrere interessante Merkmale, die im Folgenden zusammengefasst aufgeführt werden, auch wenn die Gefahr einer gewissen Redundanz damit heraufbeschworen wird:

1. Die mittlere Masse der Oligomere am vorübergehenden Maximum hängt linear von der eingesetzten Proteinkonzentration ab (Abb. 3.9). Dieses Ergebnis erklärt, weshalb über unterschiedliche Oligomergrößen in der Literatur berichtet wurden [Baskakov et al., 2002, Lu and Chang, 2002].
2. Die lineare Extrapolation der transienten Maxima zu verschwindenden Proteinkonzentrationen resultiert in einer relativen Masse von 7.9 ± 1.0 Monomermassen. Das ergibt eine Stöchiometrie von acht Monomeren, um ein stabiles, fehlgefaltetes Oligomer zu bilden. Folglich entstehen bei geringen Proteinkonzentrationen hauptsächlich Oktamere.

Überschussphänome bei Proteinaggregationsvorgängen waren Gegenstand experimenteller [Lee and Timasheff, 1977] und theoretischer [Scheele and Schuster, 1974] Studien. Die Extrapolation der maximalen Masse zu geringeren Ausgangskonzentrationen führte in diesen Arbeiten zu einer endlichen Proteinkonzentration, bei der die maximale Masse verschwindet. Diese kritische Konzentration stellt einen Schwellenwert dar, der überschritten werden muss, um den Aggregationsprozess in Gang

zu setzen. Dieses Merkmal wird im Rahmen einer nukleierten Polymerisierung erklärt [Oosawa and Asakura, 1975]. Das Überschussmerkmal bei der Fehlfaltung von SHaPrP(90-232) unterscheidet sich fundamental von diesem Verhalten. Es gibt keine kritische Konzentration, vielmehr existiert eine kleinste oligomere Einheit, die auch bei niedrigsten Ausgangskonzentrationen entsteht.

Die größeren Oligomere, die bei höheren Konzentrationen auftreten, zeigen zu späteren Zeitpunkten eine Tendenz auseinanderzufallen (Überschussphänomen Abb. 3.9). Daher stellen die Oktamere die stabilste Spezies dar. Sie werden aufgrund ähnlicher Beobachtungen bei der Aggregation von PGK zu Protofibrillen (vgl. Kapitel 2) kritische Oligomere genannt [Modler et al., 2003]. Die FTIR-Daten deuten eine Stabilisierung der kritischen Oligomere durch starke Wasserstoffbrücken zwischen den intermolekularen β -Faltblättern an. Diese Befunde decken sich mit der Beobachtung eines β -Oligomers von Baskakov et al. [Baskakov et al., 2002].

3. Die Kurvenverläufe der relativen Masse wurden zur Abschätzung apparater Bildungsrate herangezogen (Abb. 3.9 (a)). Dazu wurden die Halbwertszeiten bestimmt, die zum Erreichen der Hälfte des Maximalwerts verstreichen mussten. Diese Werte wurden als Schätzungen für τ verwendet, da eine direkte Anpassung der Kurvenverläufe wegen des auftretenden Überschussphänomens bei hohen Konzentrationen nicht möglich war. Die Steigung von 2.0 in Abb. 3.9 (d) ergibt eine augenscheinliche Reaktionsordnung von 3 (vgl. Tab. 3.1). Die gefundenen Reaktionsordnungen sind in jedem Fall niedriger als die apparente Reaktion fünfter Ordnung, die Baskakov et al. bei der Bildung des β -Oligomers durch Sprünge von 10 M auf 5 M Harnstoff beobachtete [Baskakov et al., 2001].
4. Die gefundene Dimensionalität $d = 1/0.345 = 2.99$ (Abb. 3.9 (c)) gestattet die Schlussfolgerung, dass die Oligomere eine kompakte, sphärische Struktur haben.
5. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigen die sphärische Form der oligomeren Strukturen (Abb. 3.11). Bei näherer Inspektion sind außerdem ringförmige Morphologien erkennbar. Es ist durchaus denkbar, dass die Konformation des stabilen β -Oktamers identisch mit dieser Ringstruktur ist.
6. Die schnell gebildeten Oligomere verschmelzen in einem zweiten, viel langsameren Prozess zu protofibrillären Strukturen (Abb. 3.11 (B)). Die Bildung von Protofibrillen scheint eine Nebenreaktion einer Subpopulation der Oligomere und deren Multimeren zu sein, da die Menge der Oligomere selbst nach zwei Monaten nur teilweise reduziert ist. Die Wachstumsrate des zweiten Prozesses einer Probe mit der vierfachen Ausgangskonzentration war nur leicht höher als jene in Abb. 3.10, was die Behauptung einer Nebenreaktion stützt. Es wurden keine reifen Fibrillen nachgewiesen. Vermutlich sind zu deren Bildung größere Umordnungsprozesse innerhalb der Oligomerstrukturen notwendig, die aber bei den herrschenden Umgebungsbedingungen auf eine zu hohe Aktivierungsbarriere stoßen.

7. Es konnten keine kleineren Oligomere als die kritischen Oktamere nachgewiesen werden. Selbst SEC-Messungen bei sehr geringen Proteinkonzentrationen ($c = 0.078$ g/l) erbrachten keinen Nachweis der Bevölkerung kleinerer Oligomierzustände (Abb. 3.5), was sich mit den Befunden anderer Gruppen deckt [Baskakov et al., 2001, Baskakov et al., 2002, Lu and Chang, 2002]. Anpassung der Kurvenverläufe der SEC ergab eine besonders hohe Reaktionsordnung von 3.9.

Im Folgenden werden aufbauend auf den Feststellungen der letzten beiden Abschnitte qualitative Modellvorstellungen entwickelt, um die kinetischen Befunde zu erklären. Dies kann natürlich nur ansatzweise geschehen. Quantitative Überlegungen finden sich in Anhang E, der zur Untermauerung manch salopp erscheinender Aussage dient.

Kritisches Oktamer

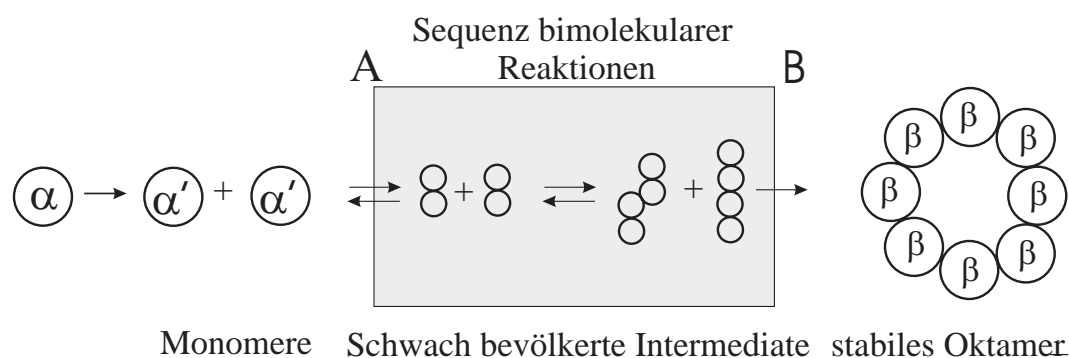


Abbildung 3.12: Modell der Bildung des kritischen Oktamers des SHaPrP(90-232). Die hypothetische Sequenz der Reaktionsschritte zwischen A und B stellt nur eine plausible Erklärung der beobachteten kinetischen Merkmale dar, die im Einklang mit den stöchiometrischen Forderungen steht.

Ein minimales Schema zur Bildung des β -reichen Oktamers, das die auftretenden kinetischen Phasen berücksichtigt, ist in Abbildung 3.12 zu sehen. Das PrP^C nimmt durch den Wechsel von nativen zu Lösungsmittelbedingungen, die ein Ablaufen der Fehlfaltungsreaktion des SHaPrP(90-232) ermöglichen, einen helikalen Zustand α' an. In diesem Zustand ist das Prion-Protein destabilisiert. Es besitzt weniger α -helikale Sekundärstruktur. Der Zustand α' verfügt über eine erhöhte Tendenz zur Aggregation. Die weiteren Schritte sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur sehr verschwommen aufgelöst. Sie sind in dem grau hinterlegten Kasten auf dem Pfad vom monomeren Zustand α' zum β -reichen Oktamer verborgen. Jedoch legen die beobachteten kinetischen Phasen und die Bildung des oktameren Endproduktes der Anzahl und Art der beteiligten Reaktionsschritte und den auftretenden Intermediatzustände einige Beschränkungen auf.

Generell können Reaktionen mit einer echt höheren Molekularität als zwei ausgeschlossen werden. Zwar würde z.B. eine trimolekulare Reaktion, die natürlich auch der

geschwindigkeitsbestimmende Schritt wäre, die beobachtete hohe Reaktionsordnung erklären können. In Lösung wurden solche Reaktionen aber tatsächlich nie beobachtet [Moore and Pearson, 1981], und man kann getrost davon ausgehen, dass sie nicht existieren. Eine trimolekulare Reaktion erfordert nämlich das gleichzeitige Zusammenstoßen dreier Reaktionspartner in einem infinitesimal kleinen Zeitintervall, was nur im Gedankenexperiment, nicht aber in der Natur realisiert werden kann. In der Realität stellt sich ein zunächst zeitlich schlecht aufgelöster Dreierstoß bei genauem Hinsehen (mit adäquater Zeitauflösung) als Abfolge zweier bimolekularer Stöße dar. Der beiden Schritten gemeinsame Reaktant, das intermediäre Dimer, ist extrem kurzlebig. Es kann bei ungenügender Zeitauflösung übersehen werden, was die Fehlinterpretation als trimolekulare Reaktion zur Folge hat. Der Anhang E rückt genau diesem Szenario mit formalen Mitteln zu Leibe, um darüberhinaus noch ein weiteres Merkmal, das im nächsten Abschnitt angesprochen wird, verständlich zu machen.

Die in Tabelle 3.1 zusammengefassten Reaktionsordnungen sind vielmehr Ausdruck der schwachen Population und damit der Kurzlebigkeit von Intermediatzuständen in einer Sequenz von bimolekularen Reaktionsschritten, was durch das Erscheinungsbild der Chromatogramme bestätigt wird (Abwesenheit jeglicher Intermediate). Als direkte Konsequenz an die auftretenden Intermediatzustände im Schema Abb. 3.12 für den Reaktionsmechanismus des β -Oktamers ergibt sich deshalb die Forderung, dass diese sehr kurzlebig und damit auch nur sehr schwach besetzt sind. Ausgedrückt durch die Ratenkonstante der Rück- und Propagationsreaktion einer intermediären Spezies bedeutet dies, dass deren Verhältnis entweder viel größer oder viel kleiner Eins ist. Im ersten Fall zerfällt das Intermediat viel eher in seine Ausgangsbestandteile, während bei der zweiten Möglichkeit das Intermediat praktisch gleich weiter reagiert. In jedem Fall ist das Intermediat kurzlebig und der Zustand schwach besetzt. Hierin besteht auch genau der Ansatzpunkt, um das scheinbar widersprüchliche Erscheinungsbild der spektroskopischen Kinetiken zu erklären. Durch die Kurzlebigkeit der Intermediate können auch die Kurvenläufe gemäß einer bimolekularen Reaktion und die gleichzeitig höhere und damit inkonsistente Konzentrationsabhängigkeit der dazugehörigen apparenten Ratenkonstante begründet werden. Auf jeden Fall erfordert dies zwei sequentielle bimolekulare Reaktionsschritte (s. h. Anhang E). Die experimentellen Daten deuten dann auf eine Konstellation hin, bei der die Ratenkonstante der Propagationsreaktion deutlich größer als jene der Rückreaktion ist.

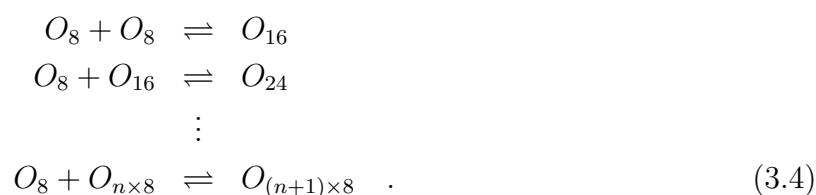
Bis jetzt wurde nur implizit auf die notwendige Reversibilität fast aller beteiligten Reaktionsschritte in Abb. 3.12 hingewiesen. Zwar weisen die Zeitverläufe aller Kinetiken und insbesondere der SEC die Merkmale irreversibler Reaktionen auf, die bisherigen Erklärungsversuche verlangen aber zwingend, dass nur der letzte Schritt, die Bildung des β -Oktamers in Abb. 3.12, irreversibel sein darf. Der Abgleich aller Methoden legt nahe, dass der letzte Schritt mit der α - β -Konversion zusammenfällt. Die gleichzeitige Strukturumwandlung würde auch die irreversible Natur des letzten Schritts in der Reaktionsabfolge untermauern. Falls frühere Schritte irreversibel wären, würde dies normalerweise die Population kleinerer Oligomierzustände nach sich ziehen. Allerdings soll dabei die Einschränkung, dass sich die Ratenkonstanten der einzelnen Teilschritte nicht um mehrere Größenordnungen unterscheiden dürfen, nicht unerwähnt bleiben. Die Amyloidbildung der

PGK ist hierfür ein Beispiel (vgl. Kapitel 2). Alle Intermediatzustände werden aufgrund des irreversiblen Charakters der beteiligten Reaktionsschritte merklich bevölkert.

Zusätzlich zu den zwei notwendigen Reaktionsschritten zur Erklärung der CD- und FTIR-Kinetiken erfordert die Bildung eines Oktamers mindestens einen weiteren bimolekularen Schritt. Mit drei konsekutiven bimolekularen Reaktionen kann zumindestens prinzipiell ein Oktamer, wie in Abb. 3.12 dargestellt, aufgebaut werden. Die aus der SEC erhaltene hohe apparente Reaktionsordnung von 3.9 bringt die Notwendigkeit für mindestens diesen einen weiteren Schritt in kinetischer Form zum Ausdruck. Durch zwei bimolekulare Schritte ist höchstens eine augenscheinliche Reaktionsordnung von drei zu rechtfertigen (s. Anhang E).

Multimere der kritischen Oligomere

Die lineare Konzentrationsabhängigkeit der relativen Masse am Maximum des vorübergehenden Überschusses kann zuerst einmal qualitativ als Folge reversibler bimolekularer Assoziationschritte des Oktamers zu größeren Multimeren, wie im untenstehenden Reaktionsschema Gl. 3.4 aufgezeichnet, interpretiert werden



Größere Oligomere sind ja auch schließlich auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 3.11 zu sehen. Das Schema garantiert durch die Verwendung eines Oktamers als Grundbaustein, dass Extrapolation zu verschwindender Konzentration als mittlere Masse genau die Oktamermasse liefert. Vorläufige theoretische Betrachtungen des Schemas weisen auf einen Bereich hin, über den die mittlere stationäre Masse linear von der Proteinkonzentration abhängt.

Protofibrillen

Durch das Schema kann natürlich der Zerfall der Multimere, also der Abbau des Maximums des Überschusses, nicht erklärt werden. Dazu bedarf es eines weiteren Prozesses, der eines der kleineren Multimere aus den Gleichgewichten von Gl. 3.4 entfernt. Das „Ziehen am Gleichgewicht“ bewirkt dann einen teilweisen Zerfall der größeren Multimere. Dies hat eine Abnahme der mittleren Masse zur Folge und erklärt den vorübergehenden Charakter des Maximums. Die Bildung von Protofibrillen könnte genau den Prozess darstellen, der eine Subpopulation der Multimere entvölkert und so den Rückgang der maximalen relativen Masse bewirkt. Allerdings scheinen die deutlich unterschiedlichen Zeitskalen, auf denen beide Prozesse stattfinden, gegen diesen Erklärungsversuch zu sprechen (vgl. Abb. 3.10).

Die Protofibrillen haben ungefähr den doppelten Durchmesser eines Oktamers (s. Abb. 3.11). Sie können daher nicht einfach als lineares Arrangement der Oktamere gedacht

werden. Der nur partielle Rückgang der Oligomerpopulationen beim Aufbau der Protofibrillen spricht dafür, dass nur gewisse Oligomere an diesem Wachstumsprozess beteiligt sind. Vermutlich spielen dabei auch noch weitere Umwandlungsprozesse auf Ebene der Sekundärstruktur eine Rolle, deren Nachweis durch die Dauer des gesamten Prozesses praktisch unmöglich ist.

3.5 Diskussion

Zur Erklärung der Bildung von PrP^{Sc} aus PrP^{C} wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, auf die bereits schon in der Einleitung 1 genauer eingegangen wurde. Die Produkte der hier vorgestellten Fehlfaltungsreaktion von SHaPrP(90-232) weisen keine Infektiösität auf, was aus der Studie von Baskakov et al. gefolgert werden kann. Bei dieser Arbeit wurden die gleichen β -reichen Oligomere erzeugt. Die Untersuchung ihres Potenzials, eine Infektion hervorrufen zu können, ergab jedoch einen negativen Befund. Allerdings erhält man nach Abbau mit Proteinase K ein einheitliches Produkt, das einen resistenten Kern ähnlich den Abbauprodukten von PrP^{Sc} aufweist [Baskakov et al., 2002]. Insofern lohnt es sich das β -Oktamer als Isoform von PrP anzusehen, die möglicherweise einen geeigneteren Ausgangszustand zur Erzeugung von PrP^{Sc} in vitro darstellt als das monomere PrP^{C} . In diesem Zusammenhang ist ein Vergleich der bisherigen Modellvorstellungen zur Entstehung von PrP^{Sc} mit der Bildungskinetik des β -Oktamers sinnvoll.

Der Notwendigkeit ein Oktamer auszubilden, um eine stabile β -faltblattreiche Konformation einnehmen zu können, ist unverträglich mit dem Vorschlag des Heterodimermechanismus von Prusiner [Prusiner, 1991]. Das Modell der nukleierten Polymerisierung beinhaltet das Auftreten oligomerer Strukturen in Form von Keimen, an denen weiteres Wachstum durch Addition von Monomeren stattfindet [Jarrett and Lansbury, 1993]. Seine kinetischen Implikationen widersprechen aber eindeutig den experimentellen Befunden bei der Produktion des β -Oktamers. Es treten keine Verzögerungsphasen auf. Es existiert keine kritische Konzentration, unterhalb derer der Prozess nicht in Gang käme. Das β -Oktamer stellt eine abgeschlossene strukturelle Einheit dar, an die keine weiteren Monomere angelagert werden können. Sie sind also keine Keime im Sinne der nukleierten Polymerisation. Auch das wesentliche Merkmal der nukleierten Konformationskonversion findet keinen Niederschlag in den kinetischen Phasen der Bildung des β -Oktamers. Bei diesem Modell wird nach der Besetzung oligomerer Zustände durch reversible bimolekulare Assoziationsschritte, deren unimolekulare Umwandlung in β -faltblattreiche Oligomere postuliert, die auch den ratenbestimmenden Schritt des Mechanismus darstellt [Serio et al., 2000]. Die Konformationsumwandlung bei der Bildung des β -Oktamers weist jedoch die Charakteristika einer bimolekularen Reaktion auf. Alle gefundenen kinetischen Phasen hängen mit einer hohen Reaktionsordnung (> 2) von der eingesetzten Proteinkonzentration ab. Die Beteiligung eines ratenbestimmenden, unimolekularen Schrittes würde dagegen zu einer Reaktionsordnung zwischen eins und zwei von der Ausgangskonzentration führen. Diese Vergleiche mit den bisher angenommenen Modellen betonen die Besonderheiten des in seinen Details unbekannten Mechanismus, der für die Bildung des β -Oktamers verantwortlich ist.

Eine weitere Bedeutung könnte dem β -Oktamer und seinem ringförmigen Erscheinungsbild (vgl. Abb. 3.11) als toxische Spezies im Rahmen der Prionenkrankheiten zuteil werden. Solch eine Rolle könnte aus der Beobachtung kleiner Oligomere des A β -Peptides, die eine toxische Wirkung während der frühen Phasen der Alzheimer-Krankheit entfalten, gefolgert werden [Selkoe, 2002]. Eine mögliche toxische Wirkung wurde auch für kleine ringförmige Oligomerstrukturen anderer Proteine, die Ablagerungen bei neurodegenerativen Krankheiten bilden, postuliert [Lashuel et al., 2002]. Die neurotoxische Wirkung wird in einer permeabilisierenden Wirkung auf Zellen vermutet, die im Falle synthetischer Vesikel nachgewiesen werden konnte [Volles et al., 2001]. Zusätzliche Nahrung erhält diese Vermutung im Kontext der Prionenerkrankungen durch die sich abzeichnende Notwendigkeit den pathogenen Mechanismus vom Infektionsmechanismus zu unterscheiden [Chiesa and Harris, 2001]. Diese Aufspaltung macht auch die Existenz einer weiteren Isoform des PrP neben dem PrP^C und dem PrP^{Sc} notwendig, die eine rein neurotoxische Wirkung ausüben kann ohne dabei selbst infektiös zu sein. Das ringförmige β -Oktamer und seine Abkömmlinge, die Multimere, könnten genau in diesem Zusammenhang zu außerordentlicher Wichtigkeit gelangen.

Vom kinetischen Standpunkt aus erhebt sich die Frage, unter welchen Bedingungen kleinere Oligomere auf dem Weg zum Oktamer nachweisbar populierte werden können. Die Entdeckung einer hexameren Anordnung von monomeren PrP-Molekülen in zweidimensionalen Kristallen aus aufgereinigten infektiösen Fraktionen des PrP^{Sc} legt ein besonderes Gewicht auf diese Fragestellung [Wille et al., 2002]. Vielleicht entpuppt sich das Mysterium des Erregers der Prionenkrankheiten als die Schwierigkeit versteckte, intermediäre Zustände zu identifizieren und erfolgreich zu stabilisieren.

4. Zur Amyloidbildung von Barstar

Das Protein Barstar stellt ein weiteres Modellsystem dar, das unter geeigneten Umgebungsbedingungen Amyloidstrukturen ausbildet und nicht mit der Pathogenese einer Krankheit verknüpft ist [Gast et al., 2003]. Im ersten Unterabschnitt wird das Molekül Barstar näher vorgestellt. Daran schließt sich die Beschreibung des sogenannten A-Zustandes von Barstar an. Ausgehend vom A-Zustand Barstars wurden durch systematische Variationen der Temperatur und Ionenstärke Umgebungsbedingungen identifiziert, bei denen Aggregation des A-Zustands von Barstar auftritt. Es wurden dabei verschiedene Aggregationsregime beobachtet. Die Endprodukte des ersten Regimes, das ähnliches Verhalten wie fraktale Wachstumsphänomene von Kolloiden zeigt, stellen amorphe Aggregate dar. Sie werden bei Raumtemperatur und entsprechender Ionenstärke gewonnen. Erhöhen der Temperatur ermöglicht den Wechsel in andere Aggregationsregime, bei denen verschiedene Typen von Fibrillen entstehen. Diesen Prozessen und deren vorwiegend qualitativer Erklärung ist der Rest des Kapitels gewidmet.

4.1 Barstar

Barstar ist der intrazelluläre Inhibitor der extrazellulären Ribonuklease Barnase, die von dem *Bacillus amyloliquefaciens* produziert wird. Der Organismus sondert das Enzym Barnase in die Umgebung ab, um dort eventuell vorhandene Ribonukleinsäuren abzubauen. Die Abbauprodukte kann der *Bacillus* dann seinem eigenen Stoffwechsel zuführen. Barstar inaktiviert Barnase durch die Bildung eines nichtkovalent gebundenen Komplexes und schützt so den Organismus vor der Barnaseaktivität, die sonst für ihn im intrazellulären Raum letal wäre [Hartley, 1989].

Barstar ist ein kleines, einkettiges Protein, das aus 89 Aminosäuren aufgebaut ist. Es besitzt zwei Cysteinreste in der Sequenz an den Positionen 40 und 82. Die Cysteinreste sind im nativen Protein im reduzierten Zustand. Die Sequenz umfasst außerdem zwei Prolinreste. Der Prolinrest an der Position 27 ist in der Transkonformation, während der Prolinrest an der Position 48 die Ciskonformation einnimmt. Die dreidimensionale Struktur des Wildtyps wurde mit Kernspinresonanz aufgeklärt [Lubienski et al., 1994] und ist in Abb. 4.1 dargestellt. Außerdem stehen Strukturen der Doppelmutante C40A/C82A, bei der die Cysteinreste durch Alaninreste ausgetauscht wurden, in Komplex mit Barnase aus kristallographischen Studien zur Verfügung [Guillet et al., 1993, Buckle et al., 1994]. Barstar ist ein kompaktes Molekül, das aus einer α/β Domäne besteht. Diese beinhaltet vier Helices und drei β -Stränge, die ein paralleles β -Faltblatt bilden (s. Abb. 4.1).



Abbildung 4.1: Raumstruktur von Barstar [Lubienski et al., 1994]. Die α -Helices sind rot und die β -Stränge sind blau eingefärbt. Die ungeordneten Bereiche des Proteinrückgrates sind in dem silbernen Farbton gehalten. Das freie Ende des β -Stranges im Vordergrund bildet den C-Terminus der Kette. Der N-Terminus fällt mit dem freien Ende des β -Stranges im Hintergrund zusammen.

Barstar ist ein exzellentes Modellprotein, dessen Faltungsmechanismus sehr detailliert untersucht wurde [Fersht, 1998, Nölting, 1999]. Der Barnase-Barstar-Komplex stellt ein Paradigma zur Untersuchung der Assoziation von Proteinen dar [Schreiber and Fersht, 1996, Gabdoulline and Wade, 1997]. Die in der Sequenz enthaltenen Prolinreste ermöglichen das Studium der Katalyse der Peptidyl-Prolyl-Cis/Trans-Isomerisierung [Golbik et al., 1999]. Barstar zeigt das Phänomen der Kältedenaturierung bei leicht zu erreichenden Temperaturen [Agashe and Udgaonkar, 1995, Wong et al., 1996]. Rückfaltung des kältedenaturierten Zustandes kann durch extrem schnelle Temperatursprungtechniken ausgelöst werden, was das Studium der frühesten Faltungsereignisse erlaubt [Ballew et al., 1996]. In Verbindung mit Analyse der Φ -Werte [Fersht, 1995] wurde die Faltung von Barstar auf der Ebene individueller Aminosäuren im Zeitbereich zwischen Mikro- und Millisekunden aufgelöst [Nölting et al., 1995, Nölting et al., 1997]. Für die Faltung [Shastry and Udgaonkar, 1995] und die Entfaltung [Zaidi et al., 1997] wurden jeweils mehrere Pfade und mehrere Intermediate beobachtet.

In dieser Arbeit wurde die pseudo Wildtypvariante C40A/C82A/P27A mit einer Molmasse von 10,252 g/mol verwendet [Nölting et al., 1995]. Die Substitution der Cysteinreste durch Alaninreste beseitigt jeden Zweifel am tatsächlichen Oxidationszustand der Cysteine während der durchgeführten Reaktionen. Der Prolinrest an der Position 27 wurde ursprünglich durch ein Alanin ersetzt, um den alleinigen Einfluss der Isomerisierung

des Prolinrestes an der Position 48 auf die Faltungsreaktion des Moleküls bestimmen zu können [Golbik et al., 1999].

4.2 A-Zustand von Barstar

Bei niedrigem pH vollzieht Barstar einen strukturellen Übergang zu einer alternativ gefalteten, nicht-nativen Konformation, die als A-Zustand klassifiziert wird [Fink et al., 1994]. Der A-Zustand von Barstar weist die Züge eines „Molten Globule“ auf [Khurana and Udgaonkar, 1994]. Der „Molten Globule“ ist ein Gleichgewichtsintermediat, das eine Sekundärstruktur ähnlich der nativen Konformation hat, aber über keine rigide Packung der Seitenketten verfügt. Er hat daher keine starre Tertiärstruktur. Ursprünglich wurde der Zustand des „Molten Globule“ aufgrund rein theoretischer Überlegungen postuliert [Ptitsyn and Rashin, 1973]. Seine tatsächliche Existenz und Relevanz für die Faltung gewisser Proteine konnte in späteren Studien belegt werden [Ptitsyn, 1995]. Der A-Zustand von Barstar besitzt die zusätzliche Besonderheit als lösliches Oligomer mit einer apparenten Masse von etwa 150,000 D in Erscheinung zu treten [Khurana et al., 1995, Juneja et al., 2002]. Strukturelle Untersuchungen mit Kernspinresonanz identifizierten eine flexible Region in den Polypeptidketten, die den oligomeren A-Zustand bei niedrigem pH bilden [Juneja et al., 2002]. Gemäß dieser Studie stellt der A-Zustand ein symmetrisches Aggregat, bestehend aus 16 Monomeren, mit einem starren Kern dar. Die ersten 20 N-terminalen Aminosäurereste der monomeren Untereinheiten nehmen jedoch die hoch dynamische Konformation eines Zufallknäuels ein. Sie weisen dabei vorübergehende Strukturen mit lokaler Ordnung auf. Partiiell gefaltete Strukturen werden als notwendige Vorläufer der Ausbildung von Amyloidstrukturen angesehen [Rochet and Lansbury, 2000]. Zusätzlich benötigen viele Proteine dabei ein saures Milieu [Rochet and Lansbury, 2000]. Der A-Zustand von Barstar erfüllt beide Bedingungen. Er stellt daher ein ideales Modell zum Studium der zusätzlichen Umgebungsbedingungen dar, die zur Ausbildung von Amyloidfibrillen führen [Gast et al., 2003].

4.2.1 Einfluss der Ionenstärke auf den A-Zustand

Der A-Zustand wurde durch Dialyse von nativen Bedingungen (50 mM Tris-HCl, pH8, 100 mM KCl) in 10 mM HCl erzeugt. In Abb. 4.2 sind die CD-Spektren des A-Zustandes im fernen UV in Abwesenheit und in Gegenwart von Salz gezeigt. Um ein Gefühl für den Grad der Entfaltung bei niedrigem pH zu vermitteln, ist auch das CD-Spektrum des kältedenaturierten Barstars dargestellt. Das Spektrum des kältedenaturierten Zustandes ist typisch für eine Polypeptidkette ohne geordnete Sekundärstruktur. Im Gegensatz dazu umfassen die CD-Spektren des A-Zustandes in 10 mM HCl die wesentlichen Merkmale des nativen Spektrums, was auf einen wesentlichen Anteil an geordneter Sekundärstruktur schließen läßt. Erhöhen der Ionenstärke durch Zugabe von NaCl begünstigt die Bildung von Sekundärstruktur. Es werden dadurch Änderungen der Spektren hervorgerufen, die sie ähnlicher zum nativen erscheinen lassen. Oberhalb von 75 mM NaCl treten keine weiteren

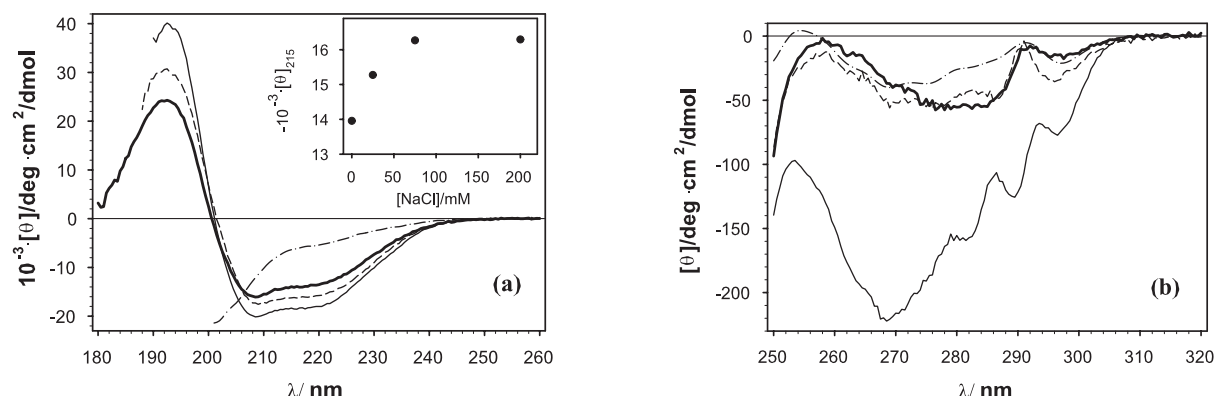


Abbildung 4.2: CD-Spektren von Barstar in verschiedenen Konformationszuständen. (a) fernes UV, (b) nahes UV. - : nativer Zustand bei $T = 20^\circ\text{C}$ in 50 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1 M KCl; ----: kältedenaturierter Zustand bei $T = 1^\circ\text{C}$ in 50 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1 M KCl, 2.2 M Harnstoff; - - : A-Zustand in 10 mM HCl bei $T = 20^\circ\text{C}$. - - : A-Zustand in 10 mM HCl, 75 mM NaCl bei $T = 20^\circ\text{C}$. Das Teilbild in (a) zeigt die Abhängigkeit der Elliptizität bei 215 nm des A-Zustandes von der NaCl-Konzentration bei $T = 20^\circ\text{C}$.

Änderungen auf (Abb. 4.2 (a) Teilbild). Trotz der existenten Sekundärstruktur mangelt es dem A-Zustand an einer rigiden Packung der Seitenketten, die typisch für eine stabile Tertiärstruktur wäre. Dies kommt durch die deutlich verringerten Amplituden der CD-Spektren im nahen UV zum Ausdruck, die ähnlich denen des kältedenaturierten Zustandes sind (Abb. 4.2 (b)). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Resultaten von Berichten aus der Literatur [Khurana and Udgaonkar, 1994, Nölting et al., 1997].

Die Ergebnisse der LS-Messungen für die untersuchten Strukturparameter der betreffenden Zustände von Barstar sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Barstar ist unter nativen Bedingungen bei pH 8 ein kompaktes Monomer. Der berechnete Wert der Molmasse beträgt $M = 10,252$ g/mol. Durch den Übergang zum kältedenaturierten Zustand nimmt der Stokes-Radius um 45% zu. Zum Vergleich ist der Wert des durch Harnstoff entfalteten Zustandes angeführt, dessen Zunahme 65% beträgt. Während die entfalteten Zustände gemäß der Streuintensität monomer sind, ist die Zunahme des Stokes-Radius des A-Zustandes vorwiegend eine Konsequenz der auftretenden Oligomerisierung, was aus den erhöhten Werten der Streuintensität abgelesen werden kann. Außer für den nativen Zustand stellen die Werte der Massen in Tabelle 4.1 Mittelwerte dar. Eine Abschätzung der Stokes-Radien individueller Proteinmoleküle ist unter diesen Umständen daher nicht möglich. Die Größe der Oligomere steigt mit Zugabe an Salz bis zu einer Grösse von ungefähr 15 Monomeren bei 75 mM NaCl an. Unterhalb dieser Salzkonzentration sind die gewonnenen Werte über Zeiträume von mehreren Tagen stabil. Oberhalb von 75 mM NaCl kommt ein Wachstumsprozess in Gang, dessen Beschreibung der Unterabschnitt 4.3 gewidmet ist.

Bedingungen	R_s/nm	$D \times 10^7/(\text{cm}^2/\text{s})$	$\bar{A}_2/(\text{ml/g})$	$M \times 10^3/(\text{g/mol})$
native ^a , 20°C	1.72 ± 0.04	12.5 ± 0.3	5 ± 3	9.96 ± 0.45
entfaltet, 20°C, 6 M Harnstoff	2.83 ± 0.07	7.57 ± 0.19	50 ± 20	n.b. ^d
kältedenaturiert, 1°C, 2.2 M Harnstoff	2.50 ± 0.06	8.58 ± 0.21	-3 ± 3	n.b.
A-Zustand ^b , 20°C, kein Salz	4.96 ± 0.24	4.32 ± 0.21	210 ± 50	50 ± 10
A-Zustand, 20°C, 75 mM NaCl	5.88 ± 0.29	3.64 ± 0.18	12 ± 3	150 ± 30
Protofibrille ^c	34 ± 1	0.63 ± 0.03	55 ± 8	$3,800 \pm 700$

Tabelle 4.1: Stokes-Radius R_s , Translationsdiffusionskoeffizient D , diffusiver Virialkoeffizient \bar{A}_2 und Molmasse M von Barstar unter dem Einfluss verschiedener Lösungsmittelbedingungen. Die Werte stellen bis auf den nativen Zustand Mittelungen über ein Ensemble von Konformationen dar. ^a 50 mM Tris-HCl, pH8, 100 mM KCl, dieses Lösungsmittel wurde auch im Falle des entfalteten und kältedenaturierten Zustandes verwendet. ^b 10 mM HCl, pH2. ^c 10 mM HCl, pH2, 75 mM NaCl, 20°C nach Inkubation der Probe für 15 Minuten bei 70°C. ^d nicht bestimmt.

4.2.2 Einfluss der Temperatur auf den A-Zustand in Abwesenheit von Salz

Die Änderungen der Sekundärstruktur, die durch Erhitzen von Barstar in 10 mM HCl von 20°C auf 80°C auftreten, wurden im fernen UV mit CD registriert. Anstatt eines kooperativen Überganges traten mehr graduelle Veränderungen in Richtung eines Spektrums eines Proteins mit wenig geordneter Sekundärstruktur auf (Abb. 4.3 (a)). Bei Temperaturen oberhalb von 40°C wurde das allmähliche Aufschmelzen der Sekundärstruktur von der Desintegration der Oligomere begleitet, die sich in der Abnahme der Streuintensität und der Stokes-Radien widerspiegelte (Daten nicht gezeigt). Ein neuer stationärer Zustand der Aggregatgrößen wurde in 20-30 Minuten nach der Temperaturänderung erreicht. Die aus der engen Verteilung errechnete mittlere Masse entspricht der eines Dimers bei 70°C. Die Probe wurde für etwa eine Stunde bei der jeweiligen Temperatur belassen. Sie wurde bei der höchsten Temperatur für drei Stunden untersucht, um eventuelle langsame Änderungen der Struktur detektieren zu können. Es traten keine weiteren Änderungen der Sekundärstruktur und des Aggregationszustandes bis zu Proteinkonzentrationen von über 1 g/l auf. Die hitzeinduzierten Strukturänderungen waren im Wesentlichen reversibel.

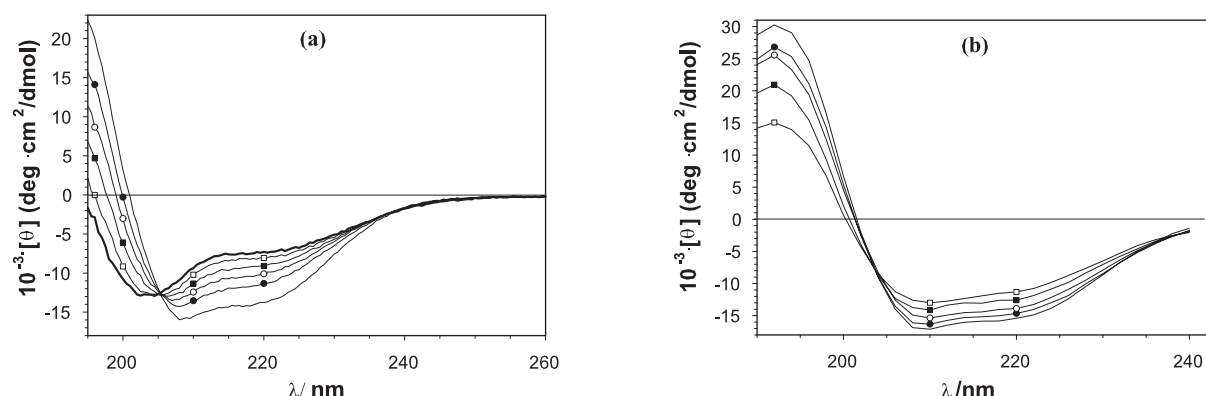


Abbildung 4.3: Temperaturabhängigkeit des CD-Spektrums von Barstar im fernen UV in 10 mM HCl (A-Zustand). (a) ohne Salz. -: $T = 20^\circ\text{C}$; -●-: $T = 40^\circ\text{C}$; -○-: $T = 50^\circ\text{C}$; -■-: $T = 60^\circ\text{C}$; -□-: $T = 70^\circ\text{C}$; -:-: $T = 80^\circ\text{C}$. (b) mit 75 mM NaCl direkt nach Erreichen der jeweiligen Temperatur. -: $T = 20^\circ\text{C}$; -●-: $T = 40^\circ\text{C}$; -○-: $T = 50^\circ\text{C}$; -■-: $T = 60^\circ\text{C}$; -□-: $T = 70^\circ\text{C}$.

Das Spektrum nach Abkühlen der Probe auf 20°C besaß einen Verlauf, der zwischen den Spektren bei Erwärmen auf 20°C und 40°C lag.

Erhöhen der Temperatur nach Zugabe von Salz in 10 mM HCl führte zu zeitabhängigen Wachstumserscheinungen, die ausführlich in Unterabschnitt 4.4 vorgestellt werden.

4.3 Amorphes Wachstum des A-Zustandes

Wie bereits erwähnt wurde, tritt bei 10 mM HCl, pH 2 und $T = 20^\circ\text{C}$ oberhalb einer Salzkonzentration von 75 mM NaCl ein Wachstumsprozess in Erscheinung. Die mittlere Masse und der mittlere Stokes-Radius der wachsenden Aggregate wurde für drei verschiedene Proteinkonzentrationen (0.2 g/l, 0.63 g/l, 1.0 g/l) bei einer Salzkonzentration von 200 mM NaCl mittels SLS bzw. DLS über einen Zeitraum von bis zu 95 Tagen verfolgt. Die durch das Programm CONTIN bestimmten Größenverteilungen bestanden im Wesentlichen jeweils aus einem relativ schmalen Peak. Die mittleren Radien der Peaks stimmen folglich mit den Radien, die mittels des Kumulatenverfahrens gewonnen wurden, sehr gut überein (vgl. Anhang A).

Der in Abb. 4.4 (a) und (b) dargestellte Wachstumsprozess besitzt zwei hervorstechende Merkmale. Erstens sind die Zeitverläufe unabhängig von der Proteinkonzentration und fallen zusammen. Zweitens tritt selbst beim längsten Beobachtungszeitraum von 95 Tagen der Probe mit 1.0 g/l keine Sättigung der gemessenen Werte auf. Die letzte Tatsache legt nahe, den gesamten Prozess als irreversibel anzusehen. Diese Interpretation wird durch die Definition, „ein Vorgang erscheint irreversibel, wenn der Anfangszustand eine im Vergleich zur Beobachtungsdauer lange Wiederkehrzeit besitzt“, die Smoluchowski in seinen bahnbrechenden Arbeiten anführte [Smoluchowski, 1916], gestützt.

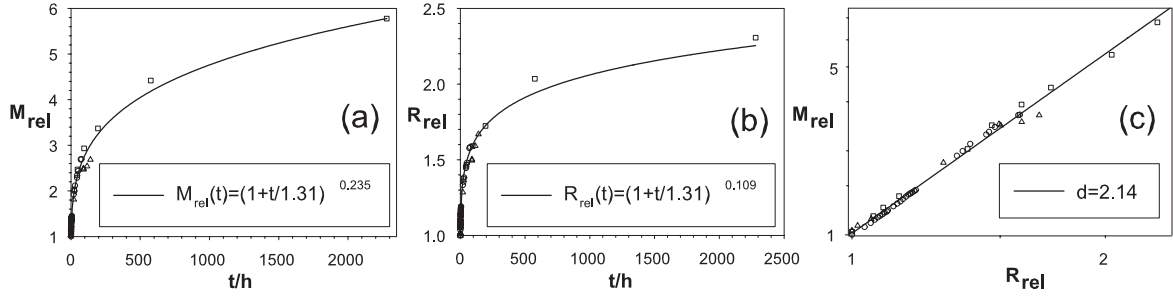


Abbildung 4.4: Amorphes Wachstum von Barstar in 10 mM HCl, pH 2, 200 mM NaCl bei $T = 20^\circ\text{C}$. Proteinkonzentrationen waren 0.2 g/l (\triangle); 0.63 g/l (\circ); 1.0 g/l (\square). (a) Messung der relativen normierten Masse $M_{rel} = M(t)/M(0)$ mit SLS. Die Werte wurden auf die Masse des Ausgangszustandes normiert. Die Daten wurden mit Gl. C.16 der verallgemeinerten Smoluchowski-Theorie angepasst (vgl. Anhang C). (b) Messung des relativen normierten Stokes-Radius $R_{rel} = R(t)/R(0)$ mit DLS. Die Werte wurden auf den Stokes-Radius des Ausgangszustandes normiert. Die Daten wurden mit der Formel, die sich nach Einsetzen des Massenskalengesetzes Gl. 2.3 in die Gl. C.16 der verallgemeinerten Smoluchowski-Theorie ergibt, angepasst. Dabei wurde der Wert für $t_c = 1.31/2$ aus der Anpassung der LS-Daten übernommen, so dass nur noch der Exponent als freier Parameter übrig blieb. (c) Doppellogarithmische Auftragung von M_{rel} über R_{rel} . Lineare Regression liefert für den Exponenten d des Massenskalengesetzes Gl. 2.3 $d = 2.14$. Das Verhältnis der Exponenten aus den Anpassungen der SLS-Daten und der DLS-Daten beträgt 2.16, was sehr gut mit dem Wert der linearen Regression aus (c) übereinstimmt und die Selbstkonsistenz der Auswertung unterstreicht.

Die gemessenen Wachstumskurven in Abb. 4.4 (a) und (b) lassen sich sehr gut durch die verallgemeinerte Smoluchowski-Koagulationstheorie anpassen (vgl. Anhang C Gl. C.16). Aus der Anpassung ergibt sich der dynamische Skalierungsexponent z zu $z = 0.235$, woraus ein Homogenitätsexponent $\lambda = -3.26$ folgt. Die bimolekularen Aggregationsraten $k_{i,j}$ nehmen folglich mit wachsender Größe der beteiligten Cluster stark ab, wenn man die Gültigkeit dieser theoretischen Beschreibung akzeptiert. Die Morphologie der entstehenden Aggregate ist in der elektronenmikroskopischen Aufnahme in Abb. 4.6 wiedergegeben. Es handelt sich um unregelmäßige, amorphe Strukturen. Die Dimensionalität des Wachstumsprozesses beträgt $d = 2.14$ (Abb. 4.4 (c)). Kolloidaggregate, die im sogenannten reaktionslimitierten Regime gebildet werden, zeichnen sich durch eine fraktale Dimension von $d = 2.1$ aus [Vicsek, 1992]. Ein völlig analoges Verhalten zu Kolloiden wurde auch für ein Protein, den menschlichen Transferrinrezeptor, unter bestimmten Bedingungen gefunden [Schüler et al., 1999]. Ich nehme aber Abstand von der Unterstellung einer wirklichen fraktalen Geometrie der Aggregate. Dazu müsste das lineare Verhalten in Abb. 4.4 (c) über Größenbereiche, die idealerweise mehrere Dekaden umfassen, gefunden werden. Tatsächlich sind die Bereiche, die beide Achsen überstreichen, kleiner als eine Größenordnung. Allerdings kann eine große Ähnlichkeit der Vorgänge nicht von der Hand gewiesen werden.

Die offenkundige Unabhängigkeit des Prozesses von der Proteinkonzentration scheint aber im eklatanten Widerspruch zu einer Beschreibung mittels einer Koagulationstheorie zu stehen. Zwar erfordert Wachstum zwingend die Beteiligung bimolekularer Schritte, die Konzentrationsunabhängigkeit kann jedoch nur durch die Beteiligung unimolekularer Reaktionsschritte erklärt werden, die sich bestimmend auf den ganzen Prozess auswirken. Eine naheliegende Vermutung ist, während der Aggregation eventuell auftretende Änderungen der Sekundärstruktur für mögliche unimolekulare Reaktionsschritte verantwortlich zu machen. Messung des CD-Spektrum im fernen UV über 100 Stunden gab keinerlei Anhaltspunkte für irgendwelche Konformationwechsel. Das Spektrum blieb in Form und Größe der Amplituden im experimentellen Fehlerbereich von 2% unverändert.

Nachfolgend wird ein zugegebenermaßen spekulativer Versuch unternommen, alle Eigenschaften des Prozesses widerspruchsfrei in Einklang miteinander zu erklären. Da zum derzeitigen Kenntnisstand keine zwingenden Einwände dagegensprechen, soll er dem Leser nicht vorenthalten werden. Juneja et al. [Juneja et al., 2002] beschreiben den A-Zustand

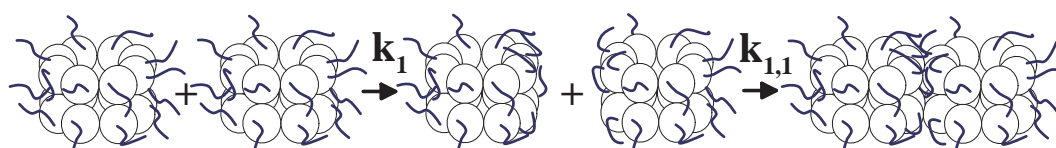
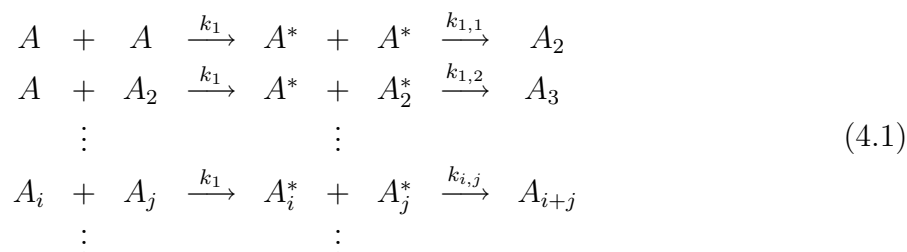


Abbildung 4.5: Versuch einer molekularen Begründung der Konzentrationsunabhängigkeit des amorphen Aggregationsprozesses des A-Zustandes von Barstar. Die Darstellung des symmetrischen 16-meren A-Zustandes als zwei aufeinandergespaltete Ringe, die aus je acht Monomeren bestehen, folgt dem Vorschlag von Juneja et al. [Juneja et al., 2002]. Sie fußt aber auf reiner Spekulation. Die frei hängenden N-terminalen Ende werden durch den ersten unimolekularen Reaktionsschritt mit der Rate k_1 „zurückgekämmt“. Dadurch werden die Kontaktfläche für den anschließenden bimolekularen Schritt mit der Rate $k_{1,1}$ freigelegt. Für $c k_{1,1}/k_1 \ll 1$ kontrolliert die Rate k_1 den unibimolekularen Prozess, der damit effektiv unabhängig von der Proteinkonzentration c wird [Chien, 1948].

von Barstar als symmetrisches Oligomer, das aus 16 Monomeren besteht, was konsistent mit der in dieser Arbeit gemessenen Molmasse ist (s. Tab. 4.1). Die monomeren Untereinheiten besetzen im Oligomer bezüglich ihrem 20 Aminosäurereste langen N-terminalen Ende äquivalente Positionen. Die N-terminalen Enden sind weitestgehend unstrukturiert und hängen frei in die umgebende Lösung heraus. Die N-terminalen Enden nehmen den Konformationsraum eines Zufallknäuels ein [Juneja et al., 2002]. Sie sind frei beweglich und verhindern somit vorerst sterisch eine bimolekulare Reaktion der Oligomere. Die Enden müssten zuerst zur Seite gebürstet werden, um eine erfolgreiche Vereinigung der Oligomere an der frei werdenden Kontaktfläche zu ermöglichen (s. Abb. 4.5). Dieser Schritt wäre folglich eine unimolekulare Reaktion, die jedem einzelnen Aggregationsschritt vorgeschaltet wäre (vgl. Gl. 4.1). Die freien Enden würden nur zur Seite geschoben, blieben aber weiterhin unstrukturiert und mobil, was die Abwesenheit jeglicher Veränderung des CD-

Spektrums im fernen UV erklärte. Die unimolekularen Reaktionschritte in diesem Modell werden durch die Ratenkonstante k_1 beschrieben (vgl. Gl. 4.1).



Die Annahme, dass k_1 unabhängig von der Größe des Multimers ist, scheint plausibel zu sein, da ein Einfluss der Multimergröße auf das „Zurückkämmen“ der N-terminalen Enden in erster Näherung nicht direkt ersichtlich ist. Die bimolekularen Aggregationsschritte werden durch die Ratenkonstanten $k_{i,j}$ zwischen Multimeren, die jeweils aus i bzw. j Oligomeren zusammengesetzt sind, charakterisiert. Der Wachstumsprozess würde effektiv unabhängig von der Konzentration c , wenn im untersuchten Konzentrationsbereich $ck_{i,j}/k_1 \ll 1$ gilt [Chien, 1948]. Die bimolekularen Ratenkonstanten werden in bewährter Weise größenabhängig angesetzt (vgl. Anhang C). Dadurch wäre auch die Anwendbarkeit von Gl. C.16 als Anpassungsfunktion gerechtfertigt, die andernfalls als rein empirisch gefundenes Modell aufgefaßt werden müsste, dem jede tieferliegende Begründung fehlte. Im Rahmen eines solchen Modells (Gl. 4.1 und Gl. C.16) ist die Abnahme der Ratenkonstanten $k_{i,j}$ mit der Größe der Multimere, die sich aus der entsprechenden Interpretation des angepassten dynamischen Skalierungsexponenten $z = 0.235$ ergibt, nicht trivial zu verstehen. Einerseits verfügen die Multimere mit wachsender Größe über mehr Kontaktflächen, andererseits kann deren Zugänglichkeit durch die Morphologie der entstehenden Multimere deutlich reduziert werden. Beide Effekte wirken sich in antagonistischer Weise auf die Größenabhängigkeit der bimolekularen Ratenkonstanten aus. Deren gefundene deutliche Abnahme im Lichte des hier vorgeschlagenen Modells legt den Hauptakzent auf den Einfluß einer erschwerten sterischen Zugänglichkeit der Kontaktflächen. Bei dieser Argumentation wird implizit angenommen, dass die Abnahme der Diffusionskoeffizienten und die Zunahme der zur Verfügung stehenden Kontaktflächen der wachsenden Multimere sich ungefähr die Waage halten (vgl. Gl. C.6).

4.4 Amyloidbildung des A-Zustandes

Im vorhergehenden Abschnitt wurde gezeigt, dass bei Raumtemperatur die Erhöhung der Ionenstärke über einen bestimmten Schwellenwert zur Aggregation in Form amorpher Aggregate führt. Das reine Abschirmen der elektrostatischen Repulsionen unter den Partikeln in Lösung gestattet jedoch nicht die Erzeugung fibrillärer Strukturen. Die Bildung von Amyloidstrukturen erfordert einen weiteren destabilisierenden Faktor, der die Population geeigneter Konformationen des A-Zustandes erlaubt, die eine erhöhte Tendenz zur Amyloidbildung besitzen. In diesem Zusammenhang hat sich die Erhöhung der Temperatur als probates Mittel herausgestellt.

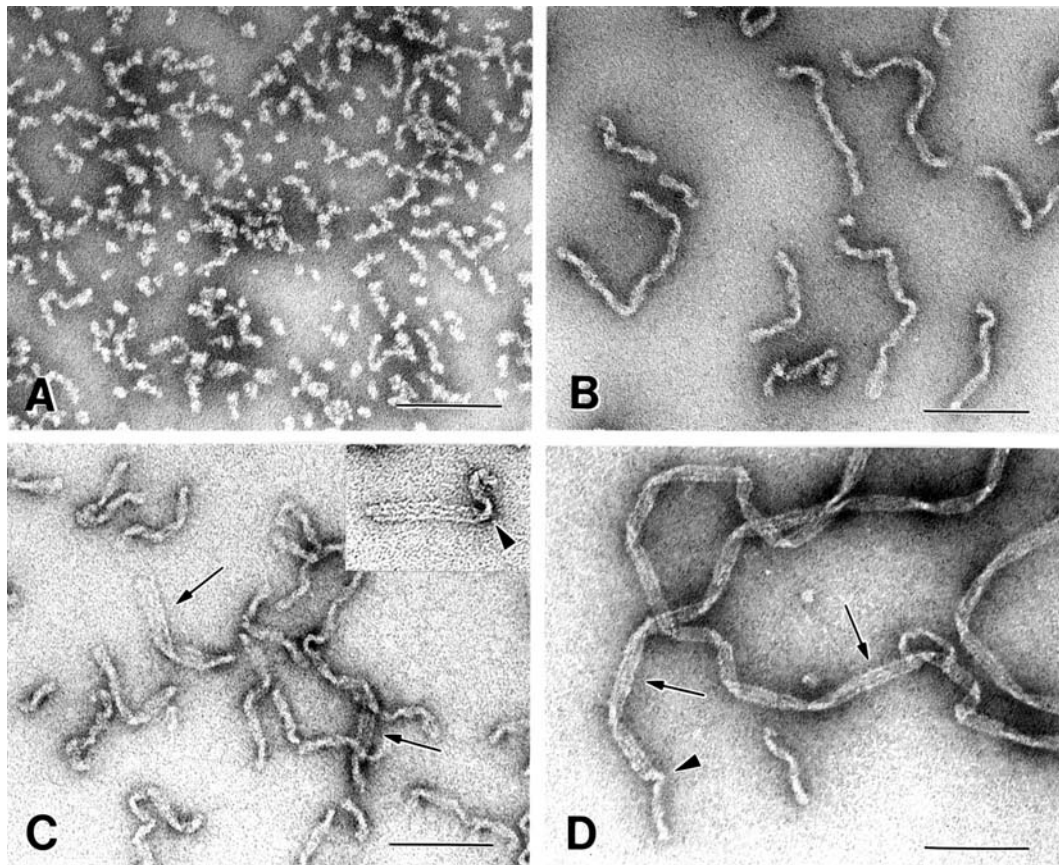


Abbildung 4.6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Endzustände von Barstar nach unterschiedlichen Strukturkonversionen. A: Amorphe Aggregate von Barstar. Die Probe mit $c = 1.0$ g/l wurde für 5 Wochen in 10 mM HCl, pH 2, 200 mM NaCl bei Raumtemperatur aufbewahrt. B: Fibrillen des Typs I. Die Probe mit $c = 0.16$ g/l wurde in 10 mM HCl, pH 2, 75 mM NaCl für 1 h bei $T = 70^\circ\text{C}$ inkubiert. C: Übergang der Typ-I-Fibrillen zu Fibrillen des Typs II. Die Probe mit $c = 7.0$ g/l wurde in 10 mM HCl, pH 2, 75 mM NaCl für 3 h bei $T = 70^\circ\text{C}$ inkubiert. Das eingefügte Teilbild zeigt die Konersion von Typ-I-Fibrillen zu Typ-II-Fibrillen. D: Typ-II-Fibrillen, die nach Inkubation von Typ-I-Fibrillen ($c = 1.03$ g/l) bei $T = 70^\circ\text{C}$ in 10 mM HCl, pH 2, für 2 h erhalten wurden. Die Pfeilspitzen zeigen auf Stellen, an denen sich die morphologische Umwandlung von Typ-I-Fibrillen in Typ-II-Fibrillen vollzieht. Alle Proben wurden vor dem Anfärben verdünnt. Länge des Balken: 100 nm.

4.4.1 Übergang A-Zustand zur Typ-I-Fibrille

Die folgenden Versuche wurden in 10 mM HCl, pH 2 mit einer Salzkonzentration von 75 mM NaCl, falls es nicht anders vermerkt ist, durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sind bei Raumtemperatur die salzinduzierten Änderungen der Sekundärstruktur des A-Zustandes und dessen Aggregation vernachlässigbar. Die meisten CD-Spektren wurden in einem speziellen Kinetikmodus aufgenommen, der die Messung eines ausreichend großen Spektralbereiches (192-240 nm in Abb. 4.3 (b)) innerhalb einer Minute erlaubt. Diese Möglichkeit stellte sich als sehr wichtig für die Messung von CD-Spektren bei erhöhten Temperaturen heraus, da zwei Arten von temperaturinduzierten spektralen Änderungen beobachtet wurden. Die erste Art der spektralen Veränderung wurde durch schnelles, teilweises Entfalten verursacht und vollzog sich innerhalb der Totzeit des Experimentes. Die anschließende Reorganisation der Sekundärstruktur, die bei höheren Temperaturen auf der Zeitskala von Minuten auftrat, begründet die zweite Art der spektralen Änderungen. Der Zeitverlauf des zweiten Prozesses konnte durch die Herangehensweise mit dem kinetischen CD-Modus aufgelöst werden. Die Zeitkonstante der Temperatursprünge von 20°C zu der jeweiligen Messtemperatur betrug ungefähr 20 s. Die Spektren, die direkt nach den jeweiligen Temperatursprüngen gemessen wurden, sind in Abb. 4.3 (b) gezeigt. Es sind Spektren, die typisch für einen partiell entfalteten Zustand Barstars bei diesen Temperaturen sind. Der Vergleich mit Abb. 4.3 (a) zeigt klar die stabilisierende Wirkung der Salzkonzentration von 75 mM NaCl. Das Spektrum bei 70° in der Gegenwart von Salz weist die Anzeichen von bemerkenswerten Anteilen an Sekundärstruktur selbst bei diesen erhöhten Temperaturen auf.

Das gleiche Spektrum ist nochmals in Abb. 4.7 (a) im Vergleich mit dem Spektrum, das sich 40 Minuten nach erfolgtem Temperatursprung als stabiles Endspektrum erwies, dargestellt. Das Endspektrum besitzt die Merkmale eines Spektrums, das über einen erhöhten Anteil an β -Strängen innerhalb der Sekundärstruktur im Vergleich zum Ausgangsspektrum verfügt. Solche zeitabhängigen Änderungen der CD-Spektren traten oberhalb einer Temperatur von 50° auf. Sie weisen auf die Bildung geordneter, aber fehlgefalteter Sekundärstruktur bei erhöhten Temperaturen hin. Die zeitlichen Änderungen des CD-Signals bei einer Wellenlänge von 215 nm sind in Abb. 4.7 (b) für die Messtemperaturen 55°, 65° und 70° aufgetragen. Der horizontale Balken gibt die Amplitude des CD-Signals bei 20° vor Erhitzen der Proben an. Aufgrund des unterschiedlichen Grades der Entfaltung wurden verschiedene CD-Amplituden direkt nach Erwärmen der Proben zu den jeweiligen Temperaturen gemessen. Der Zeitverlauf der vorgeschalteten Entfaltungsreaktion konnte nicht aufgelöst werden. Die Zeitkonstanten der anschließenden Umfaltungsprozesse nahmen deutlich mit zunehmender Temperatur ab. Die Raten des Konversionsprozesses wurden durch die Zuordnung einer reziproken Halbwertszeit, innerhalb derer das CD-Signal auf den halben Wert abfiel, charakterisiert. Die Raten sind in Abb. 4.7 (b) in Form einer Arrhenius-Auftragung als Funktion der Temperatur dargestellt. Lineare Regression ergibt für die Steigung und damit für die Aktivierungsenergie E_A des Konversionsprozesses einen Wert von (19.2 ± 2.0) kcal/mol. Die stabilen Endspektren, die nach hinreichend langen Zeiten erhalten wurden, waren für die Experimente bei den verschiedenen Temperaturen

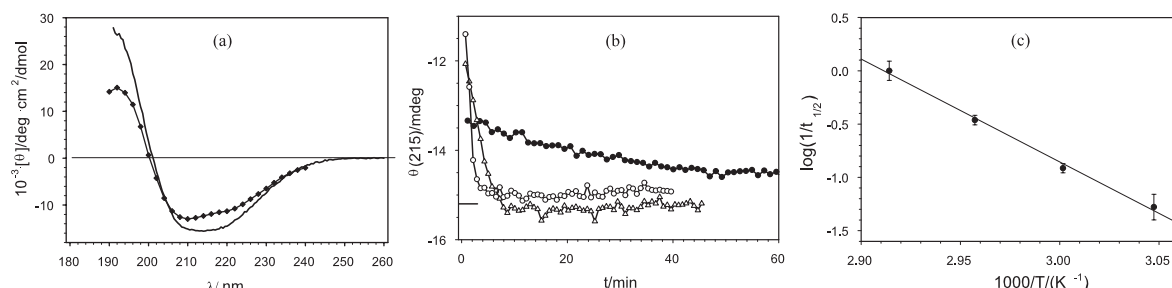


Abbildung 4.7: Änderung der Sekundärstruktur beim Übergang des A-Zustandes zur Typ-I-Fibrille beobachtet durch Circular Dichroismus. (a) CD-Spektren von Barstar mit $c = 1.08$ g/l bei $T = 70^\circ\text{C}$ in 10 mM HCl, pH 2, 75 mM NaCl. $-\diamond-$: intermediärer Zustand direkt nach dem Temperatursprung von 20°C auf 70°C . —: nach 40 min, wenn die Umwandlung abgeschlossen ist. (b) Zeitverlauf der Elliptizität bei 215 nm von Barstar ($c = 1.08$ g/l in 10 mM HCl, pH 2, 75 mM NaCl, Schichtdicke 0.102 mm) nach den Temperatursprüngen zu den angegebenen Temperaturen: $-\bullet-$: 55°C ; $-\triangle-$: 65°C ; $-\circ-$: 70°C . (c) Arrhenius-Auftragung der entsprechenden inversen Halbwertszeiten $t_{1/2}$ von den Messungen bei 55°C , 60°C , 65°C , 70°C . Die Steigung der Anpassung ergibt für die Aktivierungsenergie $E_A = (19.2 \pm 2.0)$ kcal/mol.

praktisch identisch. Das CD-Spektrum bei 20°C nach hitzeinduzierter Konversion während der kinetischen CD-Experimente bei 70°C ist in Abb. 4.13 gezeigt. Verschiedene Proben, die unter identischen Bedingungen inkubiert wurden, wiesen fast identische CD-Spektren auf, was ein Hinweis auf eine definierte Sekundärstruktur, die in reproduzierbarer Weise während der Konversion erzeugt werden kann, ist.

Die Zunahme an β -Struktur bildet ein mögliches Indiz für die Bildung intermolekularer β -Faltblätter, wie sie in den Kreuz- β -Strukturen von Amyloidfibrillen auftreten. Eine eindeutige Entscheidung kann aber nicht allein auf der Grundlage von CD-Spektren getroffen werden. Röntgenstreuung in Lösung förderte die für eine Kreuz- β -Struktur bezeichnenden Peaks zu Tage [Gast et al., 2003], die periodischen Abständen von 1.05 nm und 0.47 nm innerhalb der Aggregatstruktur entsprechen [Damaschun et al., 2000]. Auf der in Abb. 4.6 (B) gezeigten elektronenmikroskopischen Aufnahme sind Fibrillen zu sehen, die das Produkt einer einstündigen Inkubation in 10 mM HCl, pH 2, 75 mM NaCl bei 70°C sind. Die Fibrillen haben eine verdrehte, „wurmartige“ Form mit einer Länge von etwa 40 nm bis 300 nm. Die Ganghöhe der schraubenartigen Verdrehung ist ungefähr 100 nm. Zusätzliche Informationen zur Dicke der Fibrillen können durch Kleinwinkelstreuung gewonnen werden [Damaschun et al., 2000]. Es wurde ein Gyrationradius des Querschnittes von $R_C = (2.80 \pm 0.05)$ nm gemessen. Dieser Wert stimmt entweder mit einem Durchmesser von 7.93 nm für einen zirkulären Querschnitt, oder einem elliptischen Querschnitt mit Hauptachsen der Länge von 10.0 nm und 5.0 nm überein. Die Annahme eines elliptischen Querschnittes deckt sich gut mit den morphologischen Befunden der Elektronenmikrosko-

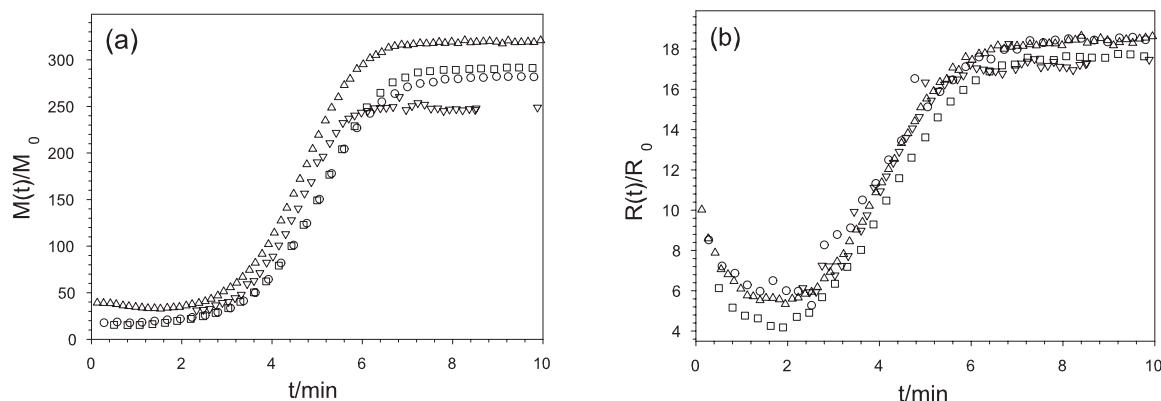


Abbildung 4.8: Konversion des A-Zustandes in Typ-I-Fibrillen in 10 mM HCl, pH 2, 75 mM NaCl bei $T = 70^\circ\text{C}$ beobachtet mit LS. Proteinkonzentrationen waren 0.14 g/l (○); 0.9 g/l (□); 4.3 g/l (△); 6.0 g/l (▽). Die Messungen wurden sofort nach Einsetzen der Probenzelle in den Zellhalter begonnen. Die Proben erreichten die spezifizierte Temperatur nach etwa 2 Minuten, was an den Zeitverläufen in (b) abgelesen werden kann. (a) Zeitabhängigkeit der relativen apparenten Masse $M(t)/M_0$ gemessen mit SLS. M_0 ist die Molmasse des monomeren Barstars. (b) Zeitabhängigkeit des relativen apparenten Stokes-Radius $R(t)/R_0$ gemessen mit DLS. R_0 ist der Stokes-Radius des monomeren Barstars unter nativen Bedingungen.

pie in Abb. 4.6 (B). Im weiteren Verlauf werden diese Strukturen als Typ-I-Fibrillen bzw. Fibrillen des Typs I bezeichnet.

Die Konversion des A-Zustandes, der bei diesen Bedingungen ungefähr aus 15 Monomeren besteht (s. Tabelle 4.1), in Typ-I-Fibrillen wird durch die in Abb. 4.8 vorgestellte zeitabhängige Zunahme der relativen, apparenten Masse und des relativen, apparenten Stokes-Radius nach dem Temperatursprung von 20°C auf 70°C reflektiert. Die Konversionsreaktion konnte jederzeit durch Absenken der Temperatur unter 50°C gestoppt werden. Die Äquilibration der Proben nach dem Temperatursprung auf 70°C nahm etwa die ersten zwei Minuten in Anspruch, was besonders deutlich den anfänglichen Verläufen der zeitabhängigen Stokes-Radien anzusehen ist (s. Abb. 4.8 (b)). Die Kurven superponieren im untersuchten Konzentrationsbereich von 0.14 g/l bis 6.0 g/l. Der Aggregationsprozess ist somit effektiv unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration. Erst dieser Befund rechtfertigt die Zuordnung einer Aktivierungsenergie zu den temperaturinduzierten zeitabhängigen Änderungen der CD-Spektren gemäß des Arrhenius-Gesetzes, die zu Beginn dieses Unterkapitels in Abb. 4.7 vorgenommen wurde. Zusätzlich sticht die abrupte Sättigung der Wachstumskurven hervor, die nach zirka 6 Minuten in ein Plateau einmünden und damit das Ende der Konversionsreaktion anzeigen. Die so produzierten Typ-I-Fibrillen zeigten nach Abkühlen auf Raumtemperatur nur minimale, reversible Veränderungen ihrer Stokes-Radien und CD-Spektren. Darüber hinaus konnten durch ausgiebiges Dialysieren der Proben gegen 10 mM HCl ohne Salz keine weiteren Veränderungen hervorgerufen werden. Die Typ-I-Fibrillen sind somit unter Bedingungen stabil, bei denen ihre Bildung nicht

initiiert werden kann. Der Konversionsprozess des A-Zustandes in Typ-I-Fibrillen ist folglich ein irreversibler Prozess.

Bei der Entwicklung eines Arbeitsmodelles zur Beschreibung der Konversionsreaktion des A-Zustandes in Typ-I-Fibrillen stellt sich ein ähnliches Problem wie bei der Beschreibung des amorphen Wachstums von Barstar (vgl. Abschnitt 4.3). Die Bildung hochmolekularer Fibrillen bedarf einer Beteiligung bimolekularer Aggregationsschritte. Die Unabhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration kann jedoch nur durch ratenlimitierende, unimolekulare Reaktionsschritte verstanden werden, die einen bestimmenden Einfluss auf den Gesamtprozess ausüben. An dieser Stelle erhebt sich direkt die Frage nach deren Anzahl und Position in der Reaktionsabfolge des Mechanismus. Im Gegensatz zum amorphen Wachstum von Barstar erlauben die zeitabhängigen Änderungen der CD-Spektren eine zumindestens teilweise begründete Zuordnung dieser unimolekularen Schritte. Zu Beginn der Konversion findet eine thermische Entfaltung statt, die in der Totzeit der Experimente lag und als reversibel angenommen werden kann, da sofortiges Absenken der Temperatur den Start der Konversionsreaktion unterbindet. Dieser Zustand wird mit A' bezeichnet.

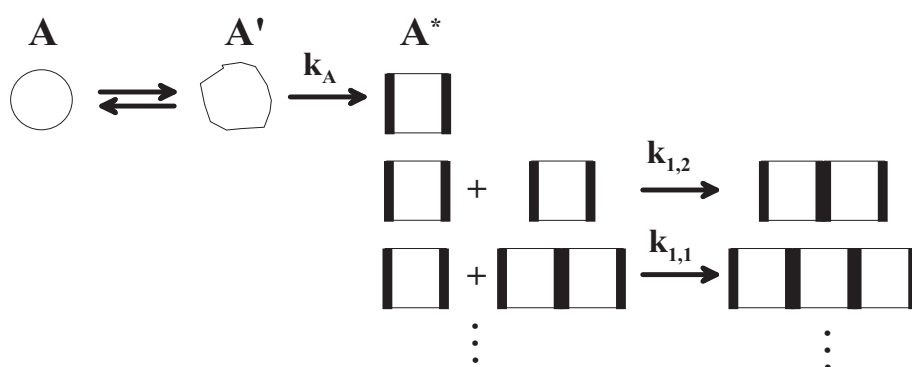


Abbildung 4.9: Reaktionsschema 1: Lumry-Eyring-Modell [Lumry and Eyring, 1954, Roberts, 2003]. Die Aktivierung des Zustandes A' mit der Rate k_A führt zu einer Aggregationskompetenten Spezies A^* . Die verbreiterten schwarzen Kanten des Quadrates, das A^* symbolisiert, deuten die intramolekularen β -Stränge an, die durch die Reorganisation der Sekundärstruktur ausgebildet werden. Die weiteren sequentiellen, bimolekularen Aggregationsreaktionen finden an diesen Kanten mit den Raten $k_{1,i}$ statt.

Die anschließende Reorganisation der Sekundärstruktur führt in Reaktionsschema 1 in Abb. 4.9 zu einem aktivierten A-Zustand A^* von Barstar, der kompetent für nachfolgende bimolekulare Aggregationsschritte ist. Dieser Schritt wäre dann die ratenlimitierende unimolekulare Reaktion, der die Aktivierungsenergie E_A von (19.2 ± 2.0) kcal/mol zugeschrieben werden müsste. Die bisherige Deutung lehnt sich an die klassische Arbeit von Lumry und Eyring [Lumry and Eyring, 1954] an, in der jedoch kein Versuch einer formalen Beschreibung der nachgeschalteten Aggregationsschritte unternommen wurde. Eine mathematische Formulierung wurde in der Arbeit von Roberts [Roberts, 2003] vorgenommen, die

neben der sequentiellen Addition von Monomeren auch höhere Clusterterme einschließt, die schon in der Smoluchowski-Koagulationstheorie (vgl. Anhang C) und dem Reaktionsschema Gl. 4.1 ihre Niederschrift fanden. Die schnelle Sättigung der Wachstumskurven in Abb. 4.11 schließt aber praktisch die Relevanz der Aggregation zwischen größeren Aggregaten aus. Sie läßt sich zwanglos durch die Annahme eines Wachstums durch sequentielle Monomeraddition erklären, der durch den raschen Verbrauch der Monomere A^* zum Erliegen kommt (vgl. Anhang C). Die Unabhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration c im getesteten Konzentrationsbereich würde wieder durch die Forderung $ck_{1,i}/k_A \ll 1$ garantiert [Chien, 1948]. Numerische Simulationen mit dem Programm MATHEMATICA [Wolfram, 2001] über breite Konzentrationsbereiche zeigen jedoch, dass die resultierenden Progresskurven nur in einem sehr engen Konzentrationsbereich superponierbar sind, da für geringe Konzentrationen die Ratenkonstanten der bimolekularen Schritte merklich an Gewicht gewinnen. Immerhin wurde bei den Experimenten ein Bereich von 0.14 g/l bis 6.0 g/l ($6.0/0.14 \approx 43$) gefunden, in dem die Wachstumskurven zusammenfallen.

Ein alternatives Reaktionsschema, in dem diese Schwierigkeit umgangen werden könnte, ist in Abb. 4.10 dargestellt. Der unimolekulare Reaktionsschritt mit der Aktivierungsener-

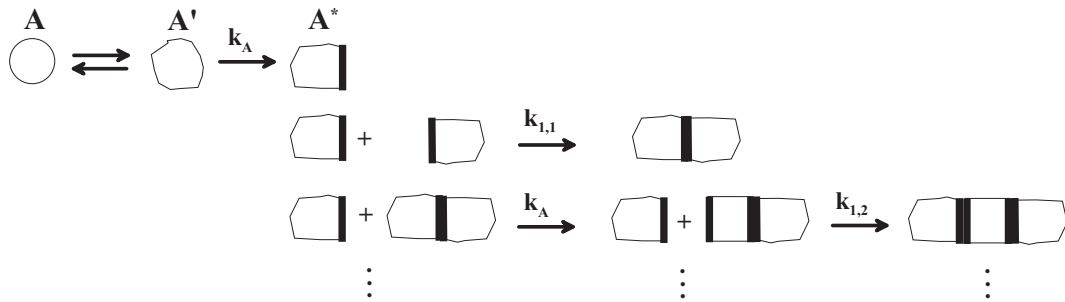


Abbildung 4.10: Reaktionsschema 2. Im Gegensatz zu Reaktionsschema 1 wird der Aktivierungsschritt mit der Rate k_A einer Region der Peptidkette zugeordnet, die auch in höheren Aggregaten einer Umorganisation bedarf, um weiteres Wachstum zu ermöglichen. Die Symbolik und die weiteren Bezeichnungen entsprechen sonst denen des ersten Reaktionsschemas in Abb. 4.9.

gie E_A beschränkt sich in Reaktionsschema 2 nicht nur auf den Zustand A' . Er muss vielmehr einer Region innerhalb der Peptidkette zugeordnet werden, die auch in bereits gebildeten Aggregaten einer Umstrukturierung bedarf, um die weitere Aggregation an den entstehenden Kanten zu erlauben [Richardson and Richardson, 2002]. Solch eine spezifische Region wurde z.B. bei der Amyloidbildung des Transthyretins durch Elektronenspinresonanz-Messungen an spinmarkierten Proben identifiziert [Serag et al., 2002].

4.4.2 Übergänge zur Typ-II-Fibrille

Bei hohen Proteinkonzentrationen schloß sich an die Konversionsreaktion des A-Zustandes in Typ-I-Fibrillen ein viel langsamerer Wachstumsprozess an, wie aus Abb. 4.11 ersichtlich ist. Zusätzliche Information über diesen Wachstumsvorgang kann durch die bewährte

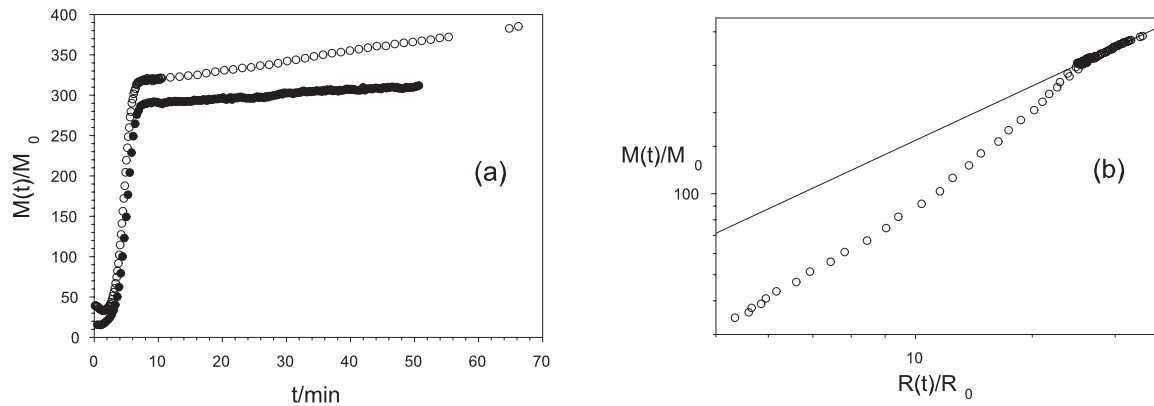


Abbildung 4.11: Überblick über den Verlauf der LS-Messungen für ausgewählte Proteinkonzentrationen, der den gesamten Beobachtungszeitraum umfasst. (a) Zeitabhängigkeit der relativen apparenten Masse $M(t)/M_0$ von Barstar in 10 mM HCl, pH 2, 75 mM NaCl bei $T = 70^\circ\text{C}$. Proteinkonzentrationen waren 0.9 g/l (●) und 4.3 g/l (○). Die Messungen wurden sofort nach Einsetzen der Probenzelle in den Zellhalter begonnen. Die Proben erreichten die spezifizierte Temperatur nach etwa 2 Minuten. Bei der höheren Proteinkonzentration ist deutlich erkennbar, dass sich an die in Abb. 4.8 dargestellte anfängliche Wachstumsphase ein zweiter Wachstumsprozess anschließt. (b) Doppellogarithmische Auftragung der apparenten Masse $M(t)/M_0$ über den relativen apparenten Stokes-Radius $R(t)/R_0$ der Messung mit $c = 4.3$ g/l. Die Anpassung an die zweite Wachstumsphase führt auf einen Exponenten von $d = 1.15$ für das Massenskalengesetz Gl. 2.3. Streng lineares Wachstum würde $d = 1$ nach sich ziehen.

doppellogarithmische Auftragung der relativen Masse über dem relativen Stokes-Radius erhalten werden. Dies wurde für die Daten der Kinetik mit $c = 4.3$ g/l ausgeführt (s. Abb. 4.11 (b)). Eine plötzliche Abnahme der Steigungen, die mit der Abnahme des Exponenten d im Ausdruck für das Massenskalengesetz Gl. 2.3 verknüpft ist, leitet den Übergang der Konversion des A-Zustandes zum zweiten Wachstumsprozess ein. Lineare Regression ergibt $d = 1.15$. Dieser Wert, der in der Nähe des Wertes für eindimensionale Strukturen liegt, deutet die Bildung länglicher, aber noch nicht völlig gerader Strukturen an. Die Morphologie dieser Strukturen wurde mittels Elektronenmikroskopie genauer begutachtet. Eine konzentrierte Lösung ($c = 7.0$ g/l) wurde für etwa drei Stunden bei 70°C in 10 mM HCl, pH 2, 75 mM NaCl inkubiert und zur Anfertigung elektronenmikroskopischer Aufnahmen entsprechend weiterverarbeitet. Die Bildung von Fibrillen mit einer anderen Morphologie ist aus Abb. 4.6 (C) ersichtlich. Diese fibrillären Strukturen werden im weiteren Fortgang der Arbeit als Typ-II-Fibrillen oder Fibrillen des Typs II bezeichnet. Ihre Morphologie zeichnet sich durch Segmente, die aus drei einzelnen Strängen bestehen, aus (s. Pfeile und Teilbild in Abb. 4.6 (C)). Die Typ-II-Fibrillen prägen ihre volle Morphologie unter Bedingungen aus, auf die im nächsten Absatz näher eingegangen wird. Sie weisen dann eine Bänderstruktur mit einer Breite von 16 nm auf. Ihre Länge kann bis zu mehrere Mikrometer erreichen (s. Abb. 4.6 (D)). Sie sind dann aus drei Protofilamenten in paralleler Ausrichtung aufgebaut und sind nicht mehr verdreht wie die Fibrillen des Typs I. Die

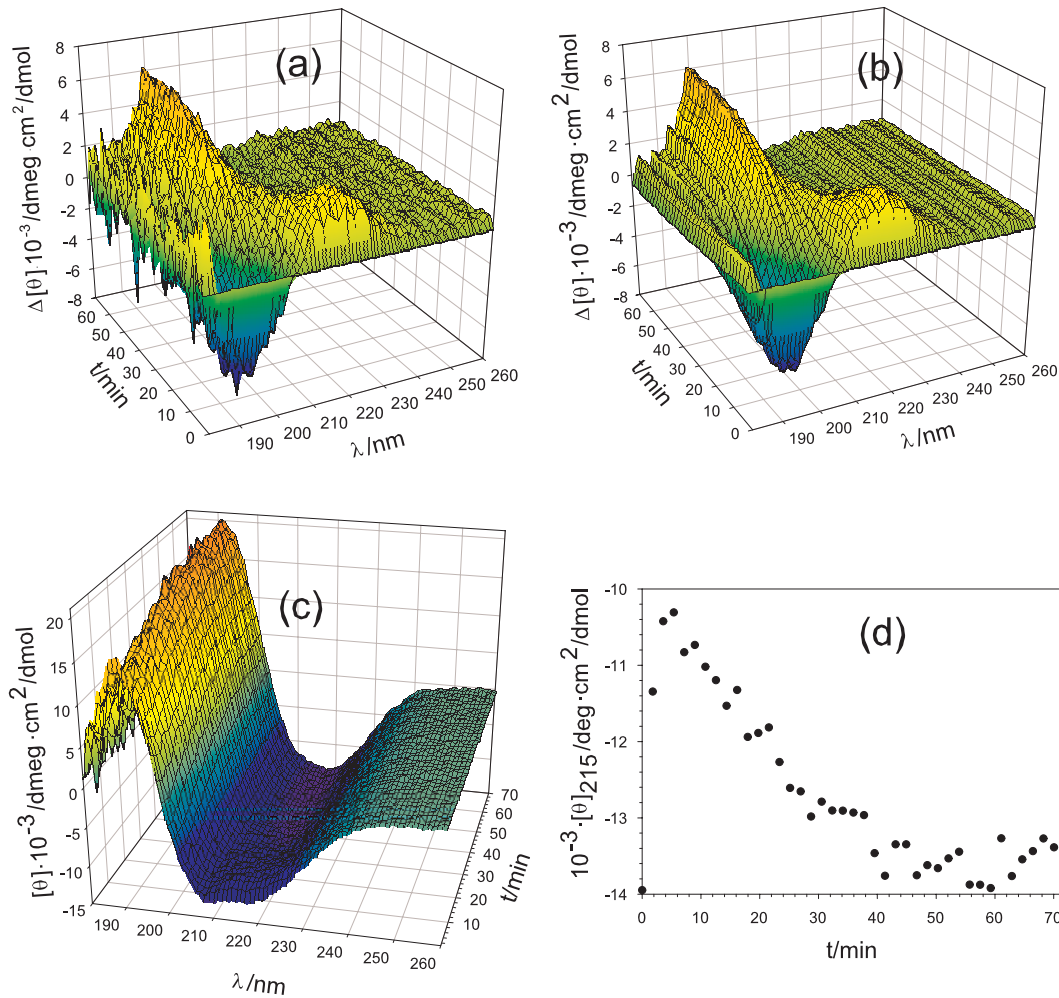


Abbildung 4.12: Konversion der Typ-I-Fibrille in Typ-II-Fibrillen bei 70°C, 10 mM HCl in der Abwesenheit von Salz beobachtet durch den Circular dichroismus im fernen UV. Die Proteinkonzentration betrug 0.92 g/l. Die Konversion wurde durch rasches Erhöhen der Temperatur von 20°C auf 70°C initiiert. Die Totzeit betrug etwa 25 s. (a) Differenzspektren. (b) Mit den ersten beiden Faktoren rekonstruierte Differenzspektren. (c) Absolutspektren (d) Zeitverlauf der Elliptizität bei 215 nm.

Umwandlung der Typ-I-Fibrillen in Typ-II-Fibrillen trat gelegentlich innerhalb desselben Aggregats auf (s. Pfeile Abb. 4.6 (C) und (D)).

Es traten unerwartete irreversible Veränderungen der CD-Spektren der Typ-I-Fibrillen, die bei 70°C in Abwesenheit von Salz inkubiert wurden, auf. Die Erwärmung auf Temperaturen von bis zu 60°C rief wahrnehmbare, jedoch reversible Änderungen der Spektren hervor. Der A-Zustand von Barstar zeigte unter dem Einfluss dieser Bedingungen eine Tendenz zur Dissoziation (vgl. Abschnitt. 4.2.2). Eine vergleichende Untersuchung der thermischen

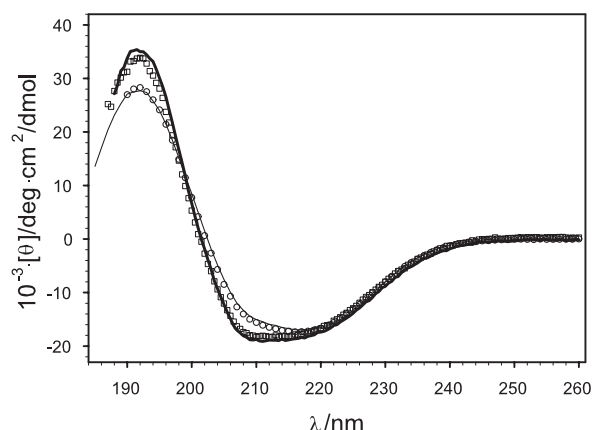
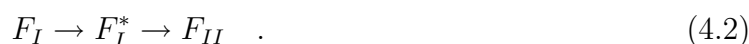


Abbildung 4.13: Vergleich der CD-Spektren von Typ-I- und Typ-II-Fibrillen. Messungen bei 20°C nach Temperatur induzierter Konversion unter den angegebenen Bedingungen. Typ I: \square : $c = 1.01$ g/l, 55 min bei 70°C in 10 mM HCl, pH 2, 75 mM NaCl; \bullet : $c = 1.09$ g/l, 75 min bei 70°C in 10 mM HCl, pH 2, 75 mM NaCl. Typ II: \circ : $c = 1.15$ g/l, 105 min bei 80°C in 10 mM HCl, pH 2, 75 mM NaCl; \circ : $c = 0.92$ g/l, 70 min bei 70°C in 10 mM HCl, pH 2, kein Salz.

Stabilität der Typ-I-Fibrillen war daher naheliegend. Die strukturellen Umwandlungen der Typ-I-Fibrillen bei 70°C wurden mittels kinetischer Messungen von CD-Spektren im Spektralbereich von 182-260 nm verfolgt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.12 dargestellt. Die Faktoranalyse der Differenzspektren förderte zwei signifikante Faktoren zu Tage, die zur Beschreibung der wesentlichen Merkmale des Datensatzes notwendig sind (s. Abb. 4.12 (a) und (b)). Die Umwandlung erfolgt also über einen intermediären Zustand (vgl. hierzu auch Anhang D) gemäß eines Dreizustandsmodells. Gleichung 4.2 bringt diesen Sachverhalt in formaler Form zum Ausdruck, wobei F_I die Typ-I-Fibrillen bezeichnet, die das Edukt der Reaktion ausmachen.



Die Population des mit F_I^* bezeichneten intermediären Zustandes kann direkt an dem Zeitverlauf der Elliptizität bei 215 nm in Abb. 4.12 (d) abgelesen werden. Die Verringerung des Betrages der Elliptizität ist 5 min nach dem Temperatursprung maximal. Der Anfangs- und Endwert sind ungefähr gleich groß. Daraus kann gefolgert werden, dass der Zustand F_I^* entfaltet und weniger strukturiert als der Anfangs- und Endzustand ist. Die Konversionsreaktion ging mit einer mehr als zweifachen Zunahme des mittleren Stokes-Radius einher. Die Morphologie der Produkte wurde mit Elektronenmikroskopie bestimmt. Die Produkte sind die bereits in Abb. 4.6 (d) vorgestellten Typ-II-Fibrillen, denen im Schema Gl. 4.2 das Symbol F_{II} zugeordnet ist. Eine ähnlich schnelle und vollständige Umwandlung wurde bei 70°C in der Gegenwart von 75 mM NaCl nie beobachtet.

Die Inkubation des A-Zustandes bei 80°C und 75 mM NaCl ergab eine vergleichbar rasante Produktion von Typ-II-Fibrillen wie die im vorherigen Absatz beschriebene Konversion von Typ-I-Fibrillen zu Typ-II-Fibrillen. Allerdings waren noch die Auswirkungen

einer eigenständigen kinetischen Phase spürbar, die vermutlich der Entstehung von Typ-I-Fibrillen zugewiesen werden kann, die aber nicht weiter aufgelöst werden konnte. Das CD-Spektrum des so erreichten Endzustandes ist ununterscheidbar von den CD-Spektren der Typ-II-Fibrillen, die bei 70°C ohne Salz produziert wurden (s. Abb. 4.13). Die CD-Spektren der Typ-I-Fibrillen mit Salz bzw. ohne Salz sind ebenfalls identisch (s. Abb. 4.13). Die CD-Spektren sind folglich eine Signatur des jeweiligen Fibrillentyps, anhand derer beide Typen leicht unterschieden werden können.

4.5 Diskussion

Der A-Zustand von Barstar bildet den Ausgangszustand aller untersuchten Prozesse dieses Kapitels. Das Übersichtsschema in Abb. 4.14 fasst alle auftretenden Produkte und die Voraussetzungen ihrer Erzeugung zusammen. Die Umgebungsbedingungen wurden durch zwei Faktoren bei sonst identischen Bedingungen variiert. Diese waren die Temperatur und die Ionenstärke in Form der zugesetzten Salzkonzentration an NaCl. Die horizontalen

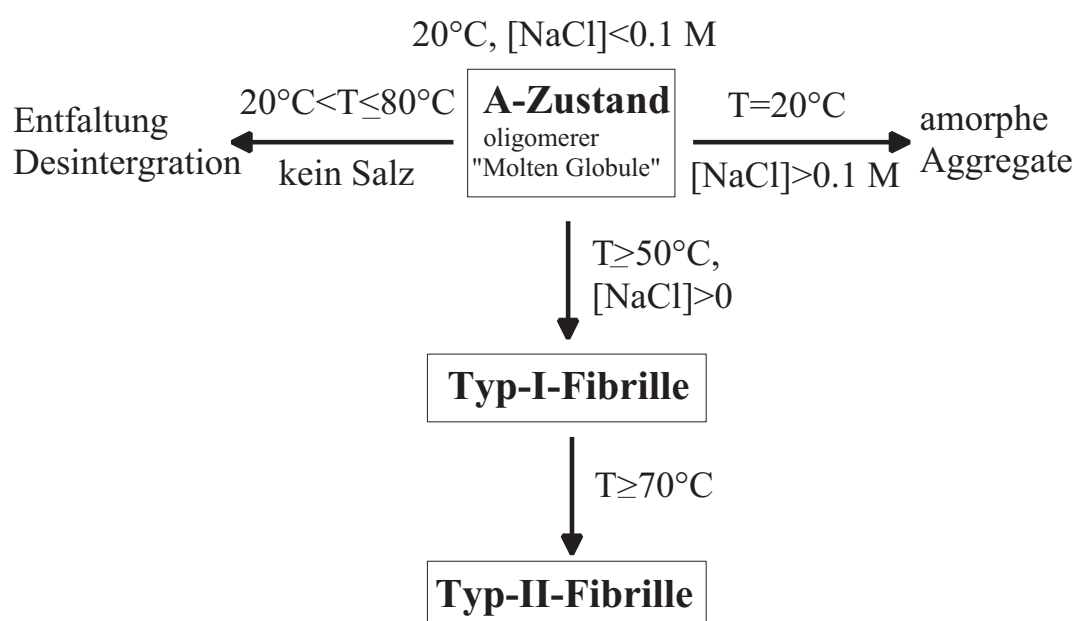


Abbildung 4.14: Überblick der auftretenden Zustände von Barstar bei pH 2. Variation der Umgebungsbedingungen durch entsprechende Einstellung der Temperatur und Ionenstärke ($[\text{NaCl}] > 0$) ruft die durch Pfeile angezeigten Konversionsreaktionen hervor. Die genauen Bedingungen sind an dem jeweiligen Reaktionspfeil spezifiziert. Die Konversion des A-Zustandes in Typ-I-Fibrillen konnte bei niedrigen Salzkonzentrationen von bis zu $[\text{NaCl}] = 25 \text{ mM}$ beobachtet werden.

Reaktionspfeile zeigen die beiden Spezialfälle an, bei denen keine Amyloidbildung ausgelöst werden konnte. Diese treten bei Variation der Temperatur in Abwesenheit von Salz oder bei moderaten Temperaturen kleiner 50°C bei sonst beliebiger Salzkonzentration ein. Die

Produktion von Amyloidstrukturen erfordert somit das Überschreiten eines spezifischen Schwellenwertes beider Parameter.

Gemäß der Nomenklatur von Fink et al. [Fink et al., 1994] verhält sich Barstar nach Säuredenaturierung wie ein Typ-II-Protein. Typ-II-Proteine werden im sauren Milieu nicht entfaltet, sondern nehmen direkt den Zustand eines „Molten Globules“ an. Der A-Zustand bei pH 2 enthält reguläre Sekundärstruktur, die vergleichbar derer des nativen Zustandes ist (s. Abb. 4.2). Es können keine Aussagen über die Kompaktheit der individuellen, partiell gefalteten Barstarmoleküle getroffen werden, da Barstar einen oligomeren Zustand einnimmt. Die in dieser Arbeit bestimmte Größe des „Molten Globule“ ähnlichen Zustandes stimmt mit vorhergehenden Resultaten aus Messungen der Sedimentationsgeschwindigkeit überein [Khurana et al., 1995]. Die LS-Messungen offenbaren (vgl. Tabelle 4.1), dass die Größe und Kompaktheit des oligomeren A-Zustandes mit steigender Ionenstärke zunimmt, bis bei einer Salzkonzentration von 75 mM NaCl eine ausgezeichnete Oligomergröße von etwa 15 Monomeren erreicht wird. Dieser Prozess wird von einer kleinen Zunahme an regulärer Sekundärstruktur begleitet, ohne dass eine starre Packung der Seitenketten nachweisbar wäre. Weiteres Erhöhen der Ionenstärke initiiert einen amorphen Wachstumsprozess, dessen Kinetik und möglicher Reaktionsmechanismus bereits in Unterkapitel 4.3 diskutiert wurde. Offensichtlich erlauben die Kettenkonformation und die Fluktuationen der Konformationen des A-Zustandes von Barstar bei Raumtemperatur keine Bildung von Amyloidfibrillen. Zur Erzeugung fibrillärer Strukturen ist die weitere Destabilisierung der Kettenkonformation notwendig.

Das Erwärmen des A-Zustandes von Barstar bis zu Temperaturen von 80° in der Abwesenheit von Salz führt zum Aufschmelzen der geordneten Sekundärstruktur in einer nicht-kooperativen Weise (vgl. Abb. 4.3). Die Fähigkeit des A-Zustandes, kleine, oligomere Zustände einzunehmen, nimmt folglich ab. Dabei handelt es sich aber keinesweges um einen naheliegenden Befund, da hydrophobe Wechselwirkungen mit zunehmender Temperatur stärker werden. Das beobachtete Zerfallen des oligomeren A-Zustandes bei höheren Temperaturen in der Abwesenheit von Salz läßt zumindestens die Tatsache, dass bei diesen Bedingungen keine Amyloidstrukturen produziert werden konnten, plausibel erscheinen. Starke repulsive elektrostatische Kräfte verhindern das Clustern der Moleküle zu größeren Gebilden. Dieses Verhalten ist bemerkenswert, da Typ-I-Fibrillen unter diesen Bedingungen in Typ-II-Fibrillen konvertiert werden konnten. Erhitzen des A-Zustandes in Abwesenheit von Salz erzeugt zwar eine hohe Plastizität der Konformationen der Barstarmonomere. Die Bildung von Amyloidfibrillen wird jedoch aufgrund der zu geringen Fähigkeit der Moleküle, Cluster zu bilden, unterdrückt.

Beide Voraussetzungen zur Erzeugung von Amyloidfibrillen sind erfüllt, wenn der A-Zustand von Barstar in der Anwesenheit von Salz erhitzt wird. Die Zugabe von Salz hat zwei grundlegende Konsequenzen. Die vorhandene Sekundärstruktur wird stabilisiert (vgl. Abb. 4.3), und die repulsiven intermolekularen Wechselwirkungen werden abgeschwächt. Letzteres spiegelt sich in der Abnahme der Größe des diffusiven Virialkoeffizienten in Tabelle 4.1 wider. Erhöhte Temperaturen bewirken ein teilweises Entfalten, aber selbst bei 70°C existieren noch bemerkenswerte Anteile an Sekundärstruktur.

Mögliche Szenarien der anschließenden Konversionsreaktion in Typ-I-Fibrillen wurden bereits diskutiert (s. Unterkapitel 4.4.1). Die hervorstechendsten Merkmale des Prozesses werden an dieser Stelle nochmals wiederholt. Es handelt sich um eine komplexe Reaktion erster Ordnung, deren Wachstumskurven im untersuchten Konzentrationsbereich superponieren. Für die In-vitro-Bildung von Amyloidfibrillen des IAPP-Proteins, das bei der Pathogenese von Diabetes II eine Rolle spielt, wurde auch eine Reaktionsordnung von eins [Padrick and Miranker, 2002] gefunden, so dass dieses Verhalten nicht als besondere Eigenheit Barstars gewertet werden kann. Sie deutet auf die maßgebliche Beteiligung unimolekularer Reaktionsschritte im Bildungsmechanismus der supramolekularen Typ-I-Fibrillen hin. Dieses Ergebnis ist nicht verwunderlich, wenn man die Lehren aus Studien zur Faltung und Rekonstitution oligomerer Proteine zum Vergleich heranzieht [Jaenicke and Lilie, 2000]. Die monomeren Bestandteile müssen meist einen unimolekularen Reaktionsschritt durchlaufen, durch den die Ausbildung der korrekt gefalteten Konformation erreicht wird. Diese erlaubt erst die Anordnung in der oligomeren Quartärstruktur. Dafür kommt z.B. der Mechanismus des „Domain Swapping“ in Frage, dem auch Bedeutung bei der Bildung von Amyloidstrukturen zugewiesen wird [Janowski et al., 2001, Liu et al., 2001]. Eine eindeutige Zuordnung der unimolekularen Reaktionsschritte des Bildungsmechanismus der Typ-I-Fibrillen ist jedoch auf dem gegenwärtigen Kenntnisstand unmöglich. Vermutlich erreichen die Konformationsfluktuationen oberhalb der Temperaturen von 50° einen kritischen Zustand, der einem Teil der Peptidketten im oligomeren A-Zustand den kooperativen Übergang zu β -Faltsträngen erlaubt. Das so entstehende kritische Oligomer ist dann in der Lage durch bimolekulare Schritte zu aggregieren.

Neben der Bildung von Typ-I-Fibrillen konnte ein zweiter struktureller Konversionsprozess nachgewiesen werden, nämlich die Bildung von Typ-II-Fibrillen. Die Typ-I-Fibrillen stellen den Ausgangsstoff dieser Reaktion dar, die über einen intermediären Zustand verläuft. Bei der Aufstellung des zugehörigen Reaktionsschemas Gl. 4.2 wurde stillschweigend angenommen, dass die beteiligten Schritte unimolekulare Reaktionen sind. Dies basiert auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 4.6 (C) und (D), auf denen Umwandlungen von Typ-I-Fibrillen in Typ-II-Fibrillen innerhalb der gleichen supramolekularen Struktur zu sehen sind. Die End-zu-End-Aggregation von Fibrillen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Gleichung 4.2 ist daher im Sinne eines minimalen Arbeitsmodells zu verstehen. Der Übergang verlangt zumindestens eine bemerkenswerte Umorganisation der Typ-I-Fibrille auf Ebene der Sekundärstruktur.

In der Literatur sind ebenfalls verschiedene Fibrillenmorphologien beschrieben, die bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen ausgeprägt werden [Lashuel et al., 2000, Aggeli et al., 2001, Zurdo et al., 2001, Kad et al., 2003]. Nach der vorherrschenden Terminologie entsprechen die Typ-I-Fibrillen in etwa Protofibrillen. Die Typ-II-Fibrillen ähneln reifen Fibrillen mit einer bänderartigen Struktur. Der Begriff der reifen Fibrille wird aber auch mit z.B. verwundenen Strukturen, die aus mehreren Filamenten aufgebaut sind, in Verbindung gebracht, sodass mit seiner Anwendung eine gewisse Vorsicht geboten ist.

5. Diskussion

Die Amyloidbildung der PGK, des Barstars und des SHaPrP(90-232) besitzt bezüglich der auftretenden Zustände klare Gemeinsamkeiten. Die Kinetiken ihrer Bildung weisen dagegen deutlich verschiedene Züge auf. Das erste Unterkapitel dient der Ausarbeitung der Gemeinsamkeiten und der spezifischen Unterschiede. Dadurch wird ein genereller Vergleich mit den in der Literatur bekannten Modelle der Amyloidbildung auf breiter Basis ermöglicht (vgl. Unterkapitel 1.3). Ein kritischer, oligomerer Zustand wurde als wesentliches gemeinsames Merkmal aller Prozesse identifiziert. Die Bedeutung solcher Zustände wird auch in der Literatur mit zunehmenden Maße erkannt. Sie gewinnen auch aus medizinischer Sicht immer mehr an Bedeutung, da durch sie Inkonsistenzen der bestehenden Arbeitshypothesen aufgelöst werden können. Ihnen ist ein eigenes Unterkapitel gewidmet. Der anschließende Abschnitt wendet sich im Lichte der zuvor gewonnenen Erkenntnisse der Amyloidbildung aus einer allgemeineren Perspektive zu. Abschließend wird ein Ausblick auf mögliche zukünftige Richtungen der Forschung gegeben, die auch von wesentlicher Bedeutung für die Anwendung im medizinischen und pharmazeutischen Sektor werden könnten.

5.1 Vergleich

Es muss vorausschickend angemerkt werden, dass die Aufklärung und Modellierung eines Reaktionsmechanismus nie einen endgültigen Charakter hat. Ein vorgeschlagenes Reaktionsschema muss selbstverständlich im Einklang mit den experimentellen Tatsachen stehen. Verbesserte experimentelle Methodiken können aber immer zur Entdeckung neuer kinetischer Phasen führen, die eine Modifikation des angenommenen Reaktionsschemas erzwingen [Moore and Pearson, 1981]. Vom allgemeinen Standpunkt aus gesehen ist die Amyloidbildung eine unbekannte Anordnung uni- und bimolekularer Reaktionsschritte. Die Faltung monomerer Proteine benötigt dagegen zur Beschreibung nur unimolekulare Reaktionsschritte [Jaenicke, 1999]. Eine Ausnahme bilden dabei natürlich jene Fälle, bei denen kurzlebige oligomere Zustände auftreten [Nöppert, 1997, Schilow and Oliveberg, 1997]. Die Amyloidbildung besitzt am meisten Verwandtschaft mit der Faltung oligomerer Proteine und den Aggregationsphänomenen, die bei der Rückfaltung von Proteinen zur Rekonstitution des nativen Zustandes auftreten können. [Jaenicke and Seckler, 1997, Jaenicke and Lilie, 2000]. Die Faltung von z. B. dimeren Proteinen wird durch einen Reaktionsmechanismus beschrieben, der aus mehreren konsekutiven Elementarschritten aufgebaut ist. Diese können drei Stufen zugeordnet werden. Die erste Stufe dient der Ausbildung der korrekt gefalteten Sekundär- und Domänenstruktur, sowie der Ausbildung der Kontakt-

flächen durch unimolekulare Reaktionsschritte. Anschließend findet der bimolekulare Assoziationsschritt statt. Daran können sich unimolekulare Schritte anknüpfen, die zur endgültigen Anordnung des Kollisionskomplexes in der nativen Struktur notwendig sein können. Ein minimales Reaktionsschema ist folglich durch die konsekutive Abfolge eines unimolekularen Reaktionsschrittes gefolgt von einer bimolekularen Reaktion und eines abschließenden unimolekularen Schrittes (unibiunimolekulare Reaktion) gegeben [Jaenicke and Seckler, 1997, Jaenicke and Lilie, 2000]. Gerade der Nachweis der letzten Stufe kann mit Problemen verbunden sein, da sie in den gemessenen kinetischen Phasen nicht immer nachweisbare Spuren hinterlassen. Die Kinetiken lassen sich daher durch ein unbimolekulares Reaktionsschema anpassen [Jaenicke and Seckler, 1997, Jaenicke and Lilie, 2000]. Das Diffusions-Kollisions-Modell der Amyloidbildung der PGK stellt ein analoges, vorausgreifendes Beispiel dar (vgl. Kap 2). Die Kreuz- β -Struktur der wachsenden Protofibrillen legt von der reinen Logik her das „Zurechtrücken“ der gebildeten intermolekularen β -Faltblätter durch nachgeschaltete unimolekulare Reaktionsschritte nahe. Bisher konnten aber keine Anhaltspunkte gefunden werden, die diesen gedanklichen Schritt erzwingen würden. Ich werde deshalb den rein pragmatischen Standpunkt in der nachfolgenden Diskussion einnehmen, nur Reaktionsschritte anzunehmen, für die eine faktische Grundlage besteht. Selbstverständlich kann sich in Zukunft erweisen, dass mancher Schritt, der als elementar angenommen wird, sich als zusammengesetzte komplexe Reaktion herausstellt. Für die allgemeinen Schlussfolgerungen dieser Diskussion stellt dies jedoch keine Einschränkung dar.

Die Amyloidbildung der drei untersuchten Proteine ist jeweils ein zweistufiger Prozess. Die einzelnen Stufen setzen sich jeweils aus mehreren Elementarschritten zusammen. Tabelle 5.1 dient dem Vergleich der ersten Reaktionsstufe. Der Ausgangszustand ist bei PGK und SHaPrP(90-232) monomer, während er bei Barstar der oligomere A-Zustand ist. Die Reaktionsabfolge der ersten Stufe kann nur durch Verwendung von Bedingungen, die eine destabilisierende Wirkung auf den nativen Zustand haben, initiiert werden. Alle drei benötigen ein saures Milieu, das eine gewisses Aufbrechen der nativen Struktur bewirkt. Der Zusatz an moderaten Mengen an Salz ist jeweils notwendig, um die elektrostatischen Abstoßungskräfte der Partikel untereinander abzuschirmen. SHaPrP(90-232) und Barstar benötigen zusätzlich noch einen weiteren Faktor, der zur Destabilisierung der Konformation beiträgt, nämlich entweder den Zusatz an Guanidiniumhydrochlorid oder eine erhöhte Temperatur. Die Ausgangszustände besitzen trotzdem jeweils eine partiell gefaltete Konformation mit wesentlichen Anteilen geordneter Sekundärstruktur.

Die Reaktionsordnung konnte bei Barstar und PGK jeweils direkt aus der Skalierung der Progresskurven mit der eingesetzten Proteinkonzentration abgelesen werden. Sie beträgt zwei bzw. eins und gestattet daher die direkte Zuordnung eines verantwortlichen Elementarschrittes, der sich prägend auf die Reaktionsordnung auswirkt und daher den ersten Schritt des Mechanismus bildet. Das weitere Wachstum kann bei PGK durch eine Reaktionskaskade bimolekularer Schritte beschrieben werden. Der genaue Verlauf der Reaktionssequenz bei Barstar ist nicht eindeutig, wobei eine Abfolge unbimolekularer Schritte am plausibelsten erscheint, da die Progresskurven sehr gut superponieren. Die Reaktionsordnung des SHaPrP(90-232) ist größer zwei und hängt von der verwendeten Methode ab. Die Modellierung in Anhang E zeigt eindeutig, dass die apparente hohe Reaktionsordnung

Merkmale der ersten Reaktionsstufe	PGK	SHaPrP(90-232)	Barstar
Ausgangszustand	partiell gefaltet, Monomer	partiell gefaltet, Monomer	partiell gefaltet, Oligomer (16-mer)
pH	2	4.2	2
Salz	[NaCl]=190 mM	[NaCl]=50 mM und [Na-acetat]=20 mM	[NaCl]>25 mM
Temperatur	20°C	20°C	$T > 50^{\circ}\text{C}$
Denaturant	-	[GuHCl]=1 M	-
Reaktionsordnung	2	> 2 (3.9; 2.5-3)	1
1. Elementarschritt	bimolekular	bimolekular	unimolekular
Besetzung der Intermediatzustände	wesentlich	sehr schwach; Zweizustandsverhalten	wesentlich
Mechanismus	Reaktionskaskade	unbekannt	sequentiell
Konversion der Sekundärstruktur	bimolekular	bimolekular	unimolekular
Endzustand	Ensemble oligomerer Zustände	definiertes Oktamer, Multimere	Typ-I-Fibrille/Protofibrille

Tabelle 5.1: Vergleich der ersten Reaktionsstufe der Amyloidbildung der Proteine PGK, Barstar und SHaPrP(90-232).

durch schwach besetzte Intermediatzustände in einer Sequenz bimolekularer Schritte erklärt werden kann. Die Verlaufskurven weisen keine Verzögerungsphasen auf. Die Signale steigen sofort nach Initiierung der Reaktion an. Die oligomeren Intermediatzustände bei Barstar und PGK werden dagegen hinreichend stark besetzt, was aus den dynamischen Lichtstreuemessungen durch Bestimmung der Radienverteilungen mittels des Programms CONTIN nachvollzogen werden kann. Die Reaktion des SHaPrP(90-232) zeigt im Gegensatz dazu einen augenscheinlichen Übergang zwischen zwei Zuständen.

Die Konversion der Sekundärstruktur erfolgt bei PGK parallel zum Wachstumsprozess. Sie weist ebenfalls die Merkmale bimolekularer Reaktionen auf und reicht bis in die zweite Stufe hinein. Das aufgestellte verallgemeinerte Diffusions-Kollisions-Modell erklärt die Kopplung der Konversion der Sekundärstruktur und des Wachstums. Die Umwandlung der Sekundärstruktur bei Barstar erfolgt durch einen oder mehrere unimolekulare Reaktionsschritte, deren Relation zu den ablaufenden bimolekularen Aggregationsschritten noch nicht eindeutig geklärt ist. Die Strukturkonversion des SHaPrP(90-232) läßt sich durch Progresskurven, denen eine bimolekulare Zweizustandsreaktion zugrundeliegt, anpassen. Sie ist daher als bimolekular in Tabelle 5.1 ausgewiesen.

Der Endzustand der ersten Reaktionsstufe ist bei PGK und SHaPrP(90-232) jeweils ein Oligomer. Im Falle der PGK handelt es sich um ein engverteiltes Ensemble mit einer mittleren Masse von 10 Monomeren. Der oligomere Zustand des SHaPrP(90-232) ist ein definiertes Oktamer. Die erste Stufe mündet bei Barstar in Typ-I-Fibrillen, die den aus der Literatur bekannten Protofibrillen gleichen [Rochet and Lansbury, 2000]. Ich verwende deshalb im weiteren Gang der Diskussion nur diese Bezeichnung, um keine unnötige Konfusion in der Terminologie zu verursachen. Die erste Reaktionsstufe ist in allen drei Fällen irreversibel. Zwar mögen insbesondere beim SHaPrP(90-232) die anfänglichen Reaktionsschritte über einen reversiblen Charakter verfügen, die letzten Reaktionsschritte sind aber in jedem Fall irreversibel. Dies wurde durch Verdünnungsexperimente oder Dialyse zu anderen Umgebungsbedingungen gezeigt. Der Ausgangszustand konnte dadurch in keinem Fall zurückgewonnen werden.

Die Produkte der ersten Stufe stellen die Ausgangszustände der anschließenden zweiten Reaktionsstufe dar, die in Tabelle 5.2 zusammengefasst ist. Bei SHaPrP(90-232) ergibt sich eine Schwierigkeit, da das Oktamer Multimere bildet. Der Ausgangszustand ist daher nicht eindeutig zu bestimmen und in Tab. 5.2 als unbekannt klassifiziert. Die Oktamere stellen aber natürlich eine notwendige Voraussetzung für die zweite Wachstumsphase dar. Die zweite Reaktionsstufe der PGK führt zur Entstehung von Protofibrillen und verläuft vergleichbar zur ersten Stufe. Sie kann innerhalb des verallgemeinerten Diffusions-Kollisions-Modells verstanden werden. Wachstum und Strukturkonversion finden gekoppelt innerhalb einer bimolekularen Reaktionskaskade statt. Das Endprodukt der zweiten Stufe des SHaPrP(90-232) sind ebenfalls Protofibrillen. Sie entstehen durch Vereinigung des Ausgangszustandes und der wachsenden Protofibrillen an ihren Enden, was aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ersichtlich ist. Die extrem langen Zeiten von bis zu mehreren Wochen machten eine genauere Charakterisierung dieses Prozesses unmöglich. Barstar bildet während der zweiten Reaktionsstufe gemäß der in der Literatur verbreiteten Terminologie reife Fibrillen. Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind teilweise

Merkmale der zweiten Reaktionsstufe	PGK	SHaPrP(90-232)	Barstar
Ausgangszustand	Ensemble oligomerer Zustände	unbekannt	Typ-I-Fibrille/ Protofibrille
Bedingung	s. Tabelle 5.1	s. Tabelle 5.1	$T \geq 70^\circ\text{C}$
Reaktionsordnung	2	nicht bestimmt	nicht bestimmt
1. Elementarschritt	bimolekular	unbekannt	unimolekular
Mechanismus	Reaktionskaskade	End-zu-End-Addition	interne Umwandlung der Typ-I-Fibrille
Konversion der Sekundärstruktur	bimolekular	unbekannt	unimolekular
Endzustand	Protofibrille	Protofibrille	Typ-II-Fibrille/ reife Fibrille

Tabelle 5.2: Vergleich der zweiten Reaktionsstufe der Amyloidbildung der Proteine PGK, Barstar und SHaPrP(90-232).

Umwandlungen von Protofibrillen in reife Fibrillen innerhalb der gleichen supramolekularen Struktur zu sehen (s. Abb. 4.6 (C) und (D)). Dadurch rechtfertigt sich die Annahme unimolekularer Reaktionsschritte in Tabelle 5.2. Natürlich können Aggregationsvorgänge zwischen Protofibrillen untereinander und mit reifen Fibrillen im weiteren Verlauf nicht ausgeschlossen werden. Diese sind sogar sehr wahrscheinlich, wenn man die erreichten Längen der reifen Fibrillen von mehreren Mikrometern in Betracht zieht. Sie scheinen aber nicht von primärer Bedeutung zu sein. Die Progresskurven der Kinetiken aller drei Proteine weisen auch noch nach Monaten einen Zuwachs aus. Die Systeme erreichen keinen Gleichgewichtszustand. Die Prozesse sind daher irreversibel.

Das in der Einleitung 1.3 vorgestellte Heterodimer-Modell und der NP-Mechanismus weisen keinerlei Gemeinsamkeiten mit der Amyloidbildung der untersuchten Proteine auf. Es konnten keine fehlgefalteten monomeren Zustände detektiert werden, denen innerhalb des Modells von Prusiner eine entscheidende Rolle zugewiesen wird. Bei der Oligomerisierung des SHaPrP(90-232) sind zwar schwach besetzte Zustände involviert, die Kinetiken aller drei untersuchten Proteine weisen jedoch keine „Lag“-Phase auf. Der NP-

Mechanismus kann daher ausgeschlossen werden. Dies ist besonders bemerkenswert, da er nach der Meinung vieler Autoren der vorherrschende Mechanismus der Amyloidbildung ist [Rochet and Lansbury, 2000, Thirumalai et al., 2003]. Das NKK-Modell teilt gewisse Gemeinsamkeiten mit der Amyloidbildung der in dieser Arbeit untersuchten Proteine [Serio et al., 2000]. Es weist oligomeren Zuständen eine tragende Rolle zu. Die Konformationskonversion tritt aber nur bei Barstar entsprechend dem NKK-Modell als unimolekulare Reaktion in Erscheinung. Zusätzlich möchte ich anmerken, dass meiner Meinung nach gerade die entscheidenden initialen Ereignisse im NKK-Modell unklar formuliert sind, dass sich diesbezüglich jeder Vergleich verbietet (s. Unterkapitel 1.3). In dieser Arbeit wurden keine Experimente, die ein Weiterwachstum gemäß des TA testen würden, vorgenommen, sodass sich vorerst keine Aussagen treffen lassen. Im Folgenden wird aber auf diesen Punkt noch näher eingegangen.

5.2 Kritische Oligomere

Die Kinetik der Bildung von Protofibrillen der PGK und des SHaPrP(90-232) vollzieht sich über die Besetzung eines intermediären Oligomerzustandes, der langlebig und stabil ist. Bei Barstar stellt der Ausgangszustand schon ein Oligomer dar, dessen Konformation noch durch die Wahl geeigneter Umgebungsbedingungen aktiviert werden muss. Die zur Aggregation befähigten Oligomere werden in der Terminologie der weiteren Diskussion als kritische Oligomere bezeichnet. Es ist offensichtlich, dass sie keine kinetischen Nuklei im Sinne eines NP-Mechanismus sind. Sie stellen aber auch keine strukturellen Nuklei dar. Bei PGK und SHaPrP(90-232) kann das direkt aus den Merkmalen der Kinetiken geschlossen werden. Sobald die ersten kritischen Oligomere während der ersten Reaktionsstufe entstehen, befinden sich noch vorwiegend Monomere in der Lösung. Diese können nicht an die kritischen Oligomere anlagern, sondern müssen auch aggregieren und den Zustand des kritischen Oligomers durchlaufen. Diese Argumentation ist auf Barstar nicht direkt übertragbar, da kein monomeres Protein unter den Bedingungen der ersten Reaktionsstufe Barstars existiert. Die erste Reaktionsstufe Barstars korrespondiert aber auch nicht mit den ersten Reaktionsstufen der PGK und des SHaPrP(90-232). Die entsprechende Stufe ist vielmehr die Erzeugung des A-Zustandes durch Säureentfaltung des nativen Zustandes. Wird die Identifizierung in dieser Form vorgenommen, bleibt das allgemeine Bild, dass die kritischen Oligomere nicht mit monomeren Proteinen assoziieren können, erhalten. Dies stellt einen fundamentalen Unterschied zum NKK-Modell dar, bei dem Wachstum auch durch Addition an die gebildeten Oligomerzustände durch das TA stattfinden kann. Die in der Konformation umgewandelten Oligomere werden bei Serio et al. als strukturierte Nuklei beschrieben [Serio et al., 2000]. Insbesondere die kritischen Oligomere der PGK und des SHaPrP(90-232) sind in einer überwiegend β -strukturhaltigen Konformation mit festgelegter Quartärstruktur organisiert und entsprechen nicht den Vorläufern der strukturellen Nuklei des NKK-Modells. Die kritischen Oligomere besitzen eine abgesättigte Quartärstruktur, die weiteres Wachstum nur durch gegenseitige Aggregation erlaubt. Die

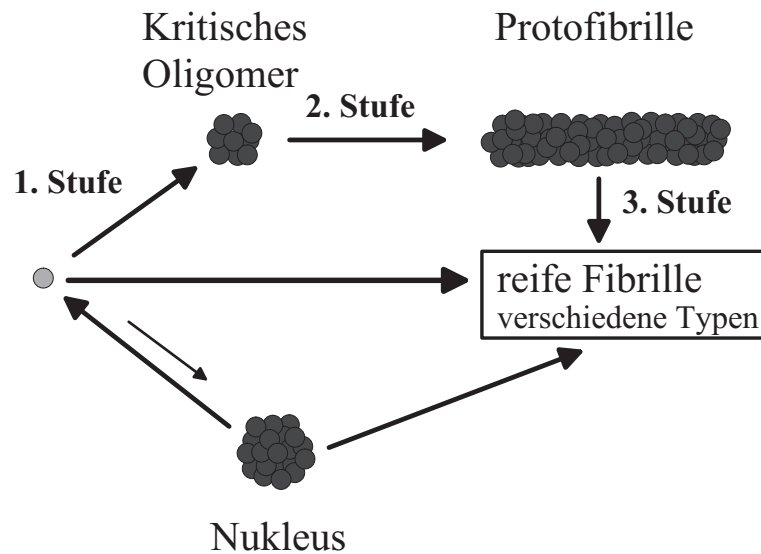


Abbildung 5.1: Überblick der Amyloidbildung. Der obere Zweig stellt den in dieser Arbeit nachvollzogenen dreistufigen Reaktionspfad dar. Kritische Oligomere und Protofibrillen sind die Zustände, die der Amyloidbildung der untersuchten Proteine gemein sind. Der hell schraffierte Kreis stellt als Ausgangspunkt ein Ensemble partiell gefalteter Monomere dar. Der untere Zweig symbolisiert die Bildung reifer Fibrillen über einen kinetischen Nukleus gemäß des NP-Mechanismus. In dieser Arbeit wurden keinerlei Anhaltspunkte für diesen Mechanismus gefunden. Die Einzeichnung ist als Tribut an die vorherrschende Meinung in der Literatur zu verstehen, die der Autor nicht teilt [Rochet and Lansbury, 2000, Thirumalai et al., 2003]. Der mittlere Pfad zeigt das Weiterwachsen reifer Fibrillen durch direkte Addition von Monomeren gemäß eines TA bzw. einer heterogenen Nukleation. Er wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Die einzelnen Pfade und die Übergänge zwischen den intermediären Zuständen des oberen Zweiges können zum Ablauf unterschiedliche Umgebungsbedingungen erfordern.

vorherrschende β -Struktur verursacht eine strukturelle Polarität innerhalb der kritischen Oligomere, die ein lineares Wachstum in protofibrilläarer Form bewirkt [Modler et al., 2003].

Die Anzahl der Monomere innerhalb eines kritischen Oligomers beträgt 10 (PGK), 8 (SHaPrP(90-232)) und 16 (Barstar). Zieht man die unterschiedlichen Längen der Peptidketten in Betracht, so läßt sich nicht ein einfacher Parameter wie z.B. eine kritische Masse ableiten.

5.3 Hierarchische Strukturbildung des Amyloids

Die Amyloidbildung der drei untersuchten Proteine besitzt zwei gemeinsame Zustände, die kritischen Oligomere und die Protofibrille. Der Übergang vom Monomer zur reifen Fibrille vollzieht sich dann, wie aus Abbildung 5.1 ersichtlich ist, über drei Reaktionsstufen. Es wurden davon bei den untersuchten Proteinen jeweils nur zwei Reaktionstu-

fen untersucht. Die Amyloidbildung des Barstars startet gemäss Abb. 5.1 bei der zweiten Stufe, während bei den beiden anderen Proteinen nur die ersten beiden Stufen bis zur Protofibrille nachvollzogen wurden. Es kann aus einer Studie aus der Literatur antizipiert werden, dass die kritischen Oligomere und Protofibrillen des SHaPrP(90-232) in reife Fibrillen konvertiert werden können. Nach Inkubation des kritischen Oligomers bei $T = 37^{\circ}\text{C}$ konnten Baskakov et al. reife Fibrillen nachweisen [Baskakov et al., 2002]. Es wurde bisher nicht weiter nach Bedingungen gesucht, die möglicherweise eine Konvertierung der Protofibrillen der PGK in reife Fibrillen erlauben würden. Die dritte Stufe stellt auch mit Abstand den am schlechtesten charakterisierten Vorgang dar. In der Literatur sind für reife Fibrillen bänderartige und verdrehte Morphologien beschrieben [Goldsbury et al., 2000]. Mehrere Gruppen kommen zu ähnlichen Übersichtsschemen der Amyloidbildung unter Verwendung verschiedener Proteine und Peptide (α -Synuclein [Hoyer et al., 2002], A β [Goldsbury et al., 2000, Blackley et al., 2000, Bitan et al., 2003], Modellpeptide [Lashuel et al., 2000, Aggeli et al., 2001], Huntingtin [Poirier et al., 2002], β_2 -Mikroglobulin [Kad et al., 2003]). In diesem Lichte stellt sich die Amyloidbildung als hierarchischer Strukturbildungsprozess dar. Das verallgemeinerte Diffusions-Kollisions-Modell [Modler et al., 2003] und das NKK-Modell [Serio et al., 2000] stellen zwei Grenzfälle zur Beschreibung der zweiten Stufe dar, wobei sich bei ersterem die Strukturkonversion als bimolekulare Reaktion und bei letzterem als unimolekulare Reaktion vollzieht. Die Beschreibung der ersten Reaktionsstufe führt auf ein noch uneinheitlicheres Bild (vgl. Tabelle 5.1 und [Serio et al., 2000]). Die Bildung des A-Zustandes von Barstar fällt dabei noch in das „klassische“ Gebiet der Proteinfaltung (vgl. 4). Die teilweise geäußerte Meinung, der generischen Amyloidstruktur liege auch ein gemeinsamer Bildungsmechanismus zugrunde [Rochet and Lansbury, 2000, Dobson, 2001], kann nicht aufrecht erhalten werden. Der mit Abstand am meisten favorisierte Mechanismus stellt das NP-Modell dar. Viele Studien charakterisieren die Amyloidbildung zwar als nukleationsabhängigen Vorgang (s. z.B. [Kad et al., 2003]). Meiner Meinung nach soll dadurch die Bedeutung struktureller Nuklei für die Amyloidbildung hervorgehoben werden. Bei Übersichtsartikeln wird dies jedoch teilweise als indikativ für einen NP-Mechanismus gewertet [Rochet and Lansbury, 2000, Thirumalai et al., 2003], was eine indifferente Verwendung der Begriffe nahelegt [Ferrone, 1999]. Die weitere Diskussion soll sich aber nicht in semantischen Betrachtungen der verwendeten Terminologie in der Literatur verlieren.

Die Situation erinnert an die frühen Zeiten der Proteinfaltung, als meist auch nur ein Mechanismus favorisiert wurde. Später stellte sich heraus, dass es mehrere Szenarien gibt. Die Faltung eines Proteins weist mehr oder weniger Gemeinsamkeiten mit einem dieser Szenarien auf [Fersht, 1998]. Besonders die Kopplung der Sekundär- und Quartärstrukturänderungen während der ersten Stufe stellt sich als komplizierter und vielseitiger heraus, als sie in den gegenwärtigen Modellen angenommen wird. Es liegt die Vermutung nahe, dass gerade sie spezifisch für die Bildung kritischer Oligomere und der nachgeschalteten Stufen verschiedener Proteine und Polypeptidketten ist.

Ein weiteres wesentliches Merkmal ist, dass die in dieser Arbeit untersuchten Systeme nie tatsächlich ein Gleichgewicht im thermodynamischen Sinne erreichten. Es liegt nahe, die Amyloidbildung als Prozess fern vom Gleichgewicht, analog der Strukturbildung von

Kolloiden [Family and Landau, 1984], aufzufassen. Die Amyloidfibrillen und ihre Vorläuferstufen würden aus dieser Perspektive gar keine chemischen Gleichgewichtszustände oder gar thermodynamischen Phasen darstellen. Die Hypothese, das Amyloid bilde einen tieferen Zustand der freien Energie als der native Zustand [Dobson, 2001, Thirumalai et al., 2003], ist mit größten konzeptionellen Schwierigkeiten behaftet, wenn man sich auf dieses Bild einlässt. Prinzipiell können nur Gleichgewichtszustände verglichen werden. Selbst wenn das Amyloid eine thermodynamische Spezies wäre, würde sie nicht auf der gleichen Hyperfläche der Freien Energie im Phasenraum liegen wie der native Zustand, da es ja Teil eines Vielkettenensembles ist. Der native Zustand wird dagegen durch den Phasenraum der generalisierten Koordinaten einer Kette beschrieben. Die intermolekularen Wechselwirkungen sind ja nicht Teil dieses Ensembles. Ein Vergleich würde schon in diesem Fall die Festlegung eines absoluten Nullpunktes der Freien Energie erfordern, weshalb er extrem schwierig aber dennoch prinzipiell durchführbar wäre. Die grundlegenden Definitionen der statistischen Physik gelten nur für ergodische Systeme [Nolting, 1993b]. Die Beschreibung von Prozessen und Zuständen fern vom Gleichgewicht ist eine bisher noch ungelöste Frage der theoretischen Physik [Egolf, 2000, Ruelle, 2001].

5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Ein zentrales Ergebnis dieser Arbeit ist die Erkenntnis, dass die Amyloidbildung ein hierarchischer Strukturbildungsprozess ist. Zum ersten Mal wurde die dabei auftretende Koppelung der Konversion der Sekundär- und Quartärstruktur systematisch untersucht. Als zentraler Intermediatzustand konnte das kritische Oligomer identifiziert werden. In Hinblick auf die Pathogenese der neurodegenerativen Krankheiten ist letzteres von besonderer Bedeutung.

Die Abwesenheit einer Korrelation zwischen der Menge an abgelagerten Amyloidfibrillen und Verlust an synaptischer Funktion bzw. Ausmaß des Absterbens von Nervenzellen im Gehirngewebe bei der Alzheimer-Krankheit, ließ Zweifel an der Amyloid-Kaskaden-Hypothese und der angenommenen primär schädigenden Wirkung der Amyloidfibrillen aufkommen [Hardy and Higgins, 1989]. Die Menge an löslichen $A\beta$ korreliert dagegen sehr gut mit den auftretenden Schädigungen des Gehirngewebes und rückt immer mehr die Bedeutung kleiner, löslicher Oligomere in das Zentrum des Forschungsinteresses [Klein et al., 2001, Kirkitadze et al., 2002]. Nach neuesten Erkenntnissen ist die Alzheimer-Krankheit in den frühen Phasen die Folge einer Verschlechterung der Synapseneffizienz im Gehirn [Selkoe, 2002]. Weitere Studien betonen die Bedeutung oligomerer Zustände auch in Verbindung mit anderen neurodegenerativen Krankheiten bzw. den allgemeinen Zusammenhang toxischer Wirkung mit oligomeren Zuständen [Bucciantini et al., 2002, Lashuel et al., 2002, Sanchez et al., 2003, Kaye et al., 2003]. Ein vordringliches Ziel der weiteren Forschung muss daher sein, die strukturellen Eigenschaften der kritischen Oligomere genauer zu bestimmen. Die ist besonders für die Entwicklung möglicher Inhibitoren der toxischen Aktivität der Oligomere wichtig.

Die Untersuchung der Ursachen neurodegenerativer Krankheiten entpuppt sich immer mehr als Forschungszweig, bei dem verschiedenste Felder von der biophysikalischen Grundlagenforschung bis zur Klinik miteinander verknüpft sind. Es ist nicht zu erwarten, dass Forschungsansätze, bei denen diese Interdisziplinarität vernachlässigt wird, Aussichten auf Erfolg haben.

A. Lichtstreuung (LS)

Die Streuung von Licht durch Proteinlösungen stellt einen Methodenkomplex zur Charakterisierung dieser Makromoleküle dar [Cantor and Schimmel, 1980]. Die theoretischen Konzepte werden hier nur für den Fall verdünnter Lösungen vorgestellt, d.h. kollektive Bewegungen und Wechselwirkungen der Proteine, sowie Mehrfachstreuung des Lichtes können vernachlässigt werden [Berne and Pecora, 1976]. Abbildung A.1 zeigt schematisch das Messprinzip, das prinzipielle Gültigkeit für alle Streumethoden hat. Bei der Lichtstreuung dient ein Laser als Quelle zur Erzeugung der Primärstrahlung in Form von elektromagnetischer Wellen. Die Primärstrahlung wird durch den Wellenvektor \vec{k}_0 charakterisiert.

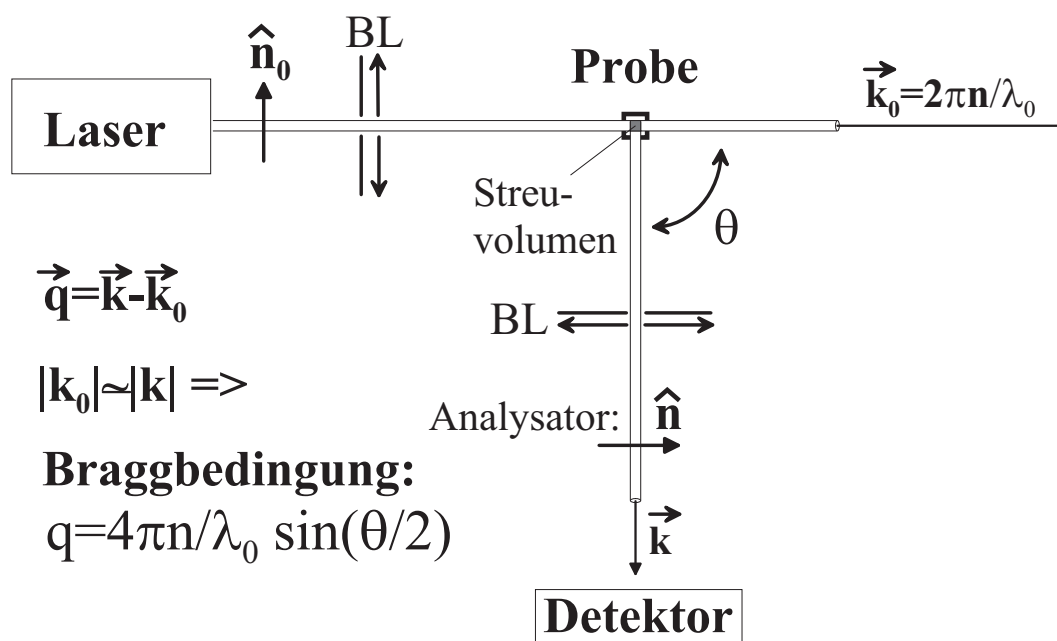


Abbildung A.1: Schematischer Aufbau einer Lichtstreuapparatur

Es wurde entweder die Wellenlänge $\lambda_0 = 514.5$ nm eines Argon-Lasers oder die Wellenlänge $\lambda_0 = 532.0$ nm eines Festkörper-Dioden-Yag-Lasers verwendet. λ_0 bezeichnet jeweils die Wellenlängen im Vakuum. Die Polarisationssebene der linear polarisierten Laserstrahlung wird durch den Einheitsvektor \hat{n}_0 in Abb. A.1 angezeigt. Sie steht senkrecht auf der Ausbreitungsrichtung, die durch den Wellenvektor \vec{k}_0 bestimmt wird. Ein Blenden- und Linsensystem (BL) dient zur Kollimation der Streustrahlung der Proteinlösung, die

in einer mit drei Fenstern versehenen Messküvette in einer thermostatisierbaren Zellhaltung fixiert ist [Gast et al., 1992]. Trifft die Primärstrahlung, die in sehr guter Näherung als ebene Welle beschrieben werden kann

$$\vec{E}_0(t, \vec{r}) = E_0 \hat{n}_0 e^{-i(\omega t - \vec{k}_0 \cdot \vec{r})} \quad , \quad (\text{A.1})$$

auf ein Proteinmolekül mit der Polarisierbarkeit α und dem Brechungsindex n , so wird dieses Streuzentrum zu periodischen Schwingungen angeregt. Dieser induzierte Dipol folgt dem periodischen Feld Gl. A.1 mit der gleichen Frequenz und wird zum Ausgangspunkt einer Kugelwelle. Dabei haben wir zwei implizite Annahmen gemacht:

1. Die Streuung erfolgt elastisch bzw. quasielastisch, d.h., dass die vom streuenden Medium absorbierte Energie im Vergleich zur Energie der Primärstrahlung vernachlässigbar klein ist, formal ausgedrückt bedeutet das $|\vec{k}_0| \simeq |\vec{k}|$. Für den in Abbildung A.1 definierten Streuvektor \vec{q} folgt dann die in der gleichen Abbildung dargestellte Braggbedingung, die \vec{q} mit dem Streuwinkel θ , unter dem die Streustrahlung nachgewiesen wird, verknüpft.
2. Der Durchmesser d des streuenden Proteinmoleküls ist klein gegenüber der Wellenlänge des verwendeten Lichtes. In dieser Näherung können intramolekulare Interferenzeffekte vernachlässigt werden. Die Streuzentren innerhalb eines Moleküls streuen in Phase (kohärente Streuung), d.h. deren Feldstärken verhalten sich additiv. Diese sogenannte Rayleigh-Näherung gilt bis die Teilchengröße in die Größenordnung des verwendeten Lichts kommt $q \cdot d \approx 1$ bzw. $d \approx \lambda/10$.

Ein in dieser Weise zur Strahlung angeregtes Partikel verhält sich wie ein Hertz'scher Dipol. Falls der Abstand R des streuenden Partikels vom Detektor hinreichend groß ist ($R > d^2/\lambda$), entspricht das elektromagnetische Feld der gestreuten Welle der Dipolstrahlung in der sogenannten Fernfeldnäherung

$$\vec{E}(R) = \sin \phi E_0 \hat{n} \alpha \frac{4\pi^2}{\lambda^2} \frac{e^{-i(\omega t - kR)}}{R} e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}} \quad , \quad (\text{A.2})$$

wobei die Bezeichnung $\lambda = \lambda_0/n$ eingeführt wurde. Der Einheitsvektor \hat{n} definiert die Richtung der Beobachtungsebene, die vom Analysator aus dem Streufeld ausgeschnitten wird. ϕ ist der Winkel zwischen Polarisationsrichtung und Beobachtungsrichtung. Bei unpolarisierter Primärstrahlung ist $\sin \phi$ durch den Faktor $(1 + \cos \phi)/2$ zu ersetzen. Die gestreute Welle wird durch ein Blenden- und Linsensystem auf den Detektor fokussiert. Alle Messungen wurden bei einem festen Streuwinkel von $\theta = 90^\circ$ durchgeführt. Die letztendlich registrierte Größe ist die Intensität der Streustrahlung, die sich als Quadrat des Betrages des gestreuten Feldes bezogen auf die Primärstrahlung zu

$$\frac{I}{I_0} = \frac{|\vec{E}(R)|^2}{|\vec{E}_0|^2} = \frac{16\pi^4 \alpha^2 \sin^2 \phi}{R^2 \lambda^4} \quad (\text{A.3})$$

ergibt. Die R^{-2} -Abhängigkeit spiegelt den Energieerhaltungssatz wider, da bei Integration von Gleichung A.3 über eine geschlossene Kugeloberfläche, die das Streuvolumen umschließt, eine abstandsunabhängige Konstante resultiert und somit die Gesamtintensität erhalten bleibt. Gleichung A.3 ist aufgrund der λ^{-4} -Abhängigkeit auch als Rayleigh-Streuung bekannt. Sie wurde im 19. Jahrhundert von Lord Rayleigh entwickelt und zur Erklärung des Himmelblaus bzw. der Morgen- und Abendröte herangezogen. Die Abstrahlcharakteristik des Hertz'schen Dipols führt zu der $\sin^2 \phi$ -Abhängigkeit und ist für unpolarisierte Primärstrahlung durch den Faktor $(1 + \cos \phi)^2/4$ zu ersetzen.

Das anschließende Unterkapitel ist der statische Lichtstreuung gewidmet. Bei dieser Methode wird, wie der Name leicht errahnen läßt, ein zeitlicher Mittelwert der Streuintensität gemessen, aus dem sich Rückschlüsse auf die Masse, Abmessung und Form der gelösten Makromoleküle ziehen lassen.

Die dynamische Lichtstreuung basiert auf der Detektion von Intensitätsfluktuationen. Sie wird im zweiten Unterkapitel vorgestellt. Für Proteine treten Intensitätsfluktuationen im Mikrosekundenbereich auf, aus denen Informationen über die Diffusionskoeffizienten der gelösten Polymere und deren effektive hydrodynamischen Abmessungen gewonnen werden können.

A.1 Statische Lichtstreuung (SLS)

Für große Makromoleküle muß deren endliche Ausdehnung berücksichtigt werden, da sie gegenüber der Wellenlänge des Lichtes nicht mehr vernachlässigt werden kann, und die Betrachtung als Punktstreuer nicht mehr gerechtfertigt ist. Vielmehr sind die verschiedenen Bereiche \vec{r}_i des Makromoleküls Ausgangspunkte von Streuwellen gemäß Gl. A.2, die untereinander eine feste Phasenbeziehung $\vec{q}\vec{r}_i$ besitzen. Die gesamte gestreute Feldstärke $\vec{E}_M(R)$ ergibt sich dann als Summe der Streuwellen der n Streuzentren des Makromoleküls.

$$\vec{E}_M(R) = \sin \phi E_0 \hat{n} \frac{4\pi^2}{\lambda^2} \frac{e^{-i(\omega t - kR)}}{R} \alpha \sum_{j=1}^n e^{i\vec{q}\cdot\vec{r}_i} \quad (\text{A.4})$$

Dabei wurde angenommen, dass die verschiedenen Streuzentren innerhalb des Polymers die annähernd gleiche Polarisierbarkeit α besitzen. Die Überschneidung des einfallenden Strahls mit dem in Richtung des Detektors gestreuten Strahls definiert ein Streuvolumen V , das in Abb. A.1 grau schraffiert ist. Dieses Streuvolumen V enthalte N Proteinmoleküle, die als unabhängige Streuer gemäß Gl. A.4 fungieren. Zwischen den N Makromolekülen bestehen keine festen Phasenbeziehungen. Sie streuen inkohärent. Somit ergibt sich die Gesamtintensität als das N -fache des zeitlichen Mittels der Intensität, die von einem Proteinmolekül gestreut wird. Die von den verschiedenen Streuzentren i desselben Moleküls ausgehenden Wellen interferieren aufgrund ihrer festen Phasenbeziehungen untereinander

$$\langle I_M(\vec{q}) \rangle = N |E_M(R)|^2 = \frac{\sin^2 \phi I_0 16\pi^4 N \alpha_M^2}{\lambda^4 R^2} \underbrace{\frac{1}{n^2} \left\langle \sum_{j=1}^n \sum_{k=1}^n e^{i\vec{q} \cdot (\vec{r}_j - \vec{r}_k)} \right\rangle}_{:=S(\vec{q})} , \quad (\text{A.5})$$

was die Modifikation der Rayleigh-Streuformel A.3 um den Faktor $S(\vec{q})$ zur Folge hat. Dieser erweitert den Gültigkeitsbereich bis zu Molekülabbmessungen d , die vergleichbar mit der Wellenlänge λ sind ($d \approx \lambda$). Die Formel A.5 wird als Rayleigh-Gans-Debye-Näherung bezeichnet. Die Funktion $S(\vec{q})$ wird Streufunktion oder auch Strukturfaktor genannt. Die Polarisierbarkeit des gesamten Makromoleküls ist definiert durch $\alpha_M := n\alpha$. Die Spitzklammern deuten die zeitliche Mittelung der Intensität an. Dieser zeitlich gemittelten Intensität liegt aufgrund der molekularen Bewegung des Proteins und der hydrodynamischen Kräfte eine gemittelte Molekülkonformation zugrunde. Im Falle ergodischer Systeme und für hinreichend große Beobachtungszeiten entspricht das durch den Detektor erfasste Zeitmittel dem Ensemblemittel über alle Molekülkonformationen.

Am Detektor wird die gemittelte Gesamtintensität $\langle I(\vec{q}) \rangle$ nachgewiesen, die sich aus den Beiträgen aller im Streuvolumen V befindlichen Streuzentren zusammensetzt. Das Lösungsmittel liefert einen Betrag $\langle I_{Lsm}(\vec{q}) \rangle$, um den die Gesamtintensität $\langle I(\vec{q}) \rangle$ korrigiert werden muss, um die Intensität der Überschussstreuung $\langle I_M(\vec{q}) \rangle$, die aufgrund der gelösten Makromoleküle zustandekommt und die eigentliche Messgröße von Interesse darstellt, zu bestimmen. Als Maß für die Überschussstreuung definieren wir

$$R_{\vec{q}} := \frac{\langle I(\vec{q}) \rangle - \langle I_{Lsm}(\vec{q}) \rangle}{I_0 \sin^2 \phi} \frac{R^2}{V} . \quad (\text{A.6})$$

Die Grösse $R_{\vec{q}}$ wird Rayleigh-Verhältnis genannt und entspricht dem durch das Streuvolumen V dividierten differentiellen Wirkungsquerschnitt, der üblicherweise bei der Betrachtung von Stoßprozessen verwendet wird [Nolting, 1993a]. Das so definierte Rayleigh-Verhältnis $R_{\vec{q}}$ ist unabhängig von dem jeweilig realisierten Messaufbau und dem durchstrahltem Streuvolumen. Es ist somit eine leicht zu vergleichende Messgröße. Für unpolarisierte Primärstrahlung ist $\sin \phi$ überall durch $(1 + \cos \phi)/2$ zu ersetzen. Formal ist die Differenz der Intensitäten, die in $R_{\vec{q}}$ eingeht, durch den Ausdruck Gl. A.5 für $\langle I_M(\vec{q}) \rangle$ gegeben. Die Polarisierbarkeit a_M des Makromoleküls ist aber keine direkt zugängliche Messgröße. Daher wird die Differenz der Brechungsindizes zwischen Lösung und Lösungsmittel benutzt, die mit der Polarisierbarkeit a_M über die Clausius-Mosotti-Beziehung in Verbindung steht

$$\begin{aligned} \alpha_M^2 &\stackrel{1.}{=} \frac{1}{16\pi^2} \left(\frac{V}{N} \right)^2 \langle (n^2 - n_{Lsm}^2)^2 \rangle \stackrel{2.}{=} \frac{1}{16\pi^2} \left(\frac{V}{N} \right)^2 \left\langle \left(\left\{ n_{Lsm} + \frac{dn}{dc} c \right\}^2 - n_{Lsm}^2 \right)^2 \right\rangle \\ &\stackrel{3.}{\simeq} \frac{1}{4\pi^2} \left(\frac{V}{N} \right)^2 n_{Lsm}^2 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \langle c^2 \rangle \stackrel{4.}{\simeq} \frac{1}{4\pi^2} \left(\frac{V}{N} \right)^2 n_{Lsm}^2 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \langle \Delta c^2 \rangle , \end{aligned} \quad (\text{A.7})$$

die durch den ersten Gleichungsschritt in der Rechnung A.7 gegeben ist. Da wir nur verdünnte Lösungen von Makromolekülen betrachten, kann der Brechungsindex n der Polymerlösung durch eine Taylorreihe, deren Entwicklungspunkt der Brechungsindex des Lösungsmittels n_{Lsm} ist, angenähert werden, die nach dem ersten Glied abgebrochen wird. Ausmultiplikation und Beibehaltung der niedrigsten Ordnung in der Konzentration c liefert den Ausdruck des dritten Schrittes. Dabei verwendeten wir ausserdem, dass die Mittelung einer Summe gleich der Summe der gemittelten Summanden ist. Im vierten Schritt der Herleitung A.7 geht nochmals die Annahme einer verdünnten Lösung ein, da für diese das Schwankungsquadrat der Konzentration praktisch dem mittleren Quadrat entspricht. Bis auf das Schwankungsquadrat enthält der Ausdruck nun direkt messbare Grössen. Der Brechungsindex n_{Lsm} und das Brechungsindexinkrement dn/dc können durch refraktometrische Methoden bestimmt werden.

Die Fluktuationstheorie der statistischen Mechanik [Yamakawa, 1971] liefert einen verwertbaren Zusammenhang zwischen dem Schwankungsquadrat der Konzentration und dem osmotischen Druck Π der Makromoleküle

$$\langle \Delta c^2 \rangle = k_B T \left(\frac{\partial^2 G(T, \Pi, c)}{\partial c^2} \right)^{-1} = \frac{k_B T}{V} c \left(\frac{\partial \Pi}{\partial c} \right)^{-1}_{T,V}, \quad (\text{A.8})$$

wobei G die freie Gibbsenthalpie, k_B die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur bezeichnen. Für den osmotischen Druck Π verwenden wir seine Virialentwicklung [Yamakawa, 1971]

$$\Pi = N_A k_B T \left\{ \frac{c}{M} + A_2 c^2 + A_3 c^3 + \dots \right\}, \quad (\text{A.9})$$

wobei M das Molekulargewicht des Polymers ist. Der zweite Virialkoeffizient A_2 erlaubt Aussagen über die Stärke und das Vorzeichen der Wechselwirkung zwischen den Makromolekülen [Yamakawa, 1971]. Ein positiver Wert für A_2 weist auf attraktive Wechselwirkungen zwischen den Partikeln hin, während negative A_2 für repulsive Verhältnisse stehen. Die höheren Virialkoeffizienten A_i ($i > 2$) können bei verdünnten Polymerlösungen vernachlässigt werden. Zur übersichtlicheren Gestaltung der Ausdrücke fassen wir alle optischen Konstanten im sogenannten Kontrastterm K zusammen

$$K = \frac{4\pi^2}{\lambda^4} \frac{n_{Lsm}^2}{N_A} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2. \quad (\text{A.10})$$

Einsetzen der Gleichung A.5 in den Ausdruck A.6 für das Rayleigh-Verhältnis $R_{\vec{q}}$ unter Verwendung der Ausdrücke A.7, A.8, A.9 und A.10 führt nach entsprechenden Umformungen auf die Fundamentalgleichung der statischen Lichtstreuung

$$\frac{Kc}{R_{\vec{q}}} = \frac{1}{S(\vec{q})} \left[\frac{1}{M} + 2A_2 c + 3A_3 c^2 + \dots \right], \quad (\text{A.11})$$

die auch Zimm-Debye-Gleichung genannt wird. In Abbildung A.2 sind die Streufunktionen für verschiedene Teilchenformen dargestellt. Die angenommene Partikelgröße von

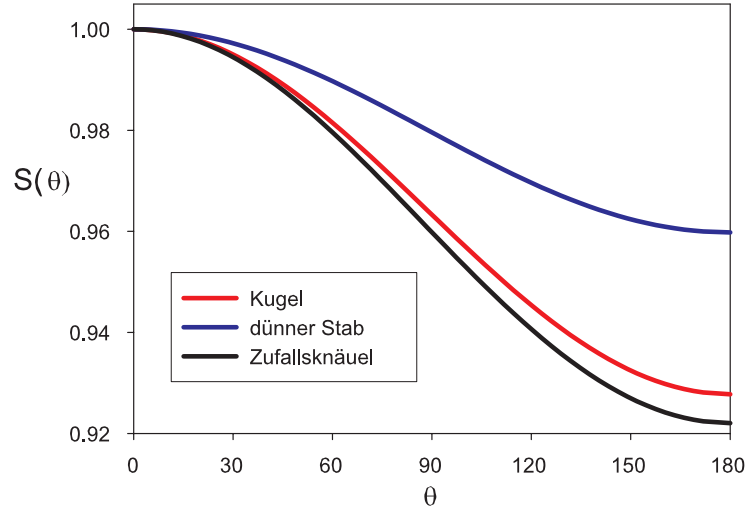


Abbildung A.2: Streufunktionen für verschiedene Teilchenformen: Zufallsknäuel mit End-zu-End-Abstand $R_E = 50$ nm, homogene, kompakte Kugel mit Durchmesser $d = 50$ nm, dünnes Stäbchen mit Länge $l = 50$ nm. Die Streufunktionen wurden für eine Wellenlänge $\lambda = 514.5$ nm der Primärstrahlung gemäß den in [Springer, 1970] gegebenen Ausdrücken berechnet, wobei der Zusammenhang zwischen dem Betrag des Streuvektors q und dem Streuwinkel θ durch die Braggbedingung gegeben ist. Es muss nur der Betrag des Streuvektors q berücksichtigt werden, da die betrachteten Teilchen als homogen und isotrop angenommen werden.

$d = 50$ nm kann als Obergrenze für die typischen Größen der Proteinaggregate, die im Hauptteil dieser Arbeit untersucht werden, angesehen werden. Die Abweichung vom Wert eins beträgt bei einem Streuwinkel von $\theta = 90^\circ$ bei dieser Teilchengröße maximal 4%, wie von der Ordinate abgelesen werden kann. Deshalb wurde der Einfluss der Streufunktion in dieser Arbeit vernachlässigt. Das Molekulargewicht der Makromoleküle und deren Aggregate wurde durch Extrapolation der Zimm-Debye-Gleichung A.11 gegen verschwindende Konzentration c bestimmt, was experimentell durch Verdünnungsreihen zu niedrigerer Proteinmonomerkonzentration hin geschah.

Bei Polymerisierungsvorgängen muss die Polydispersität der gelösten Makromoleküle beachtet werden. Die Streuintensitäten der verschiedenen Sorten i der gelösten Polymere verhalten sich additiv, was sich auf das Rayleigh-Verhältnis überträgt. Extrapolation der Zimm-Debye-Gleichung liefert dann das Gewichtsmittel M_w der Molmassen der gelösten Polymere

$$\frac{R(\vec{q})}{Kc} = \frac{\sum_i R_i(\vec{q})}{K \sum_i c_i} = \frac{\sum_i c_i M_i S_i(\vec{q})}{\sum_i c_i} \simeq \frac{\sum_i c_i M_i}{\sum_i c_i} = M_w. \quad (\text{A.12})$$

Dabei haben wir vereinfachend angenommen, dass der Einfluss der verschiedenen Streufunktionen $S_i(\vec{q})$ vernachlässigbar klein ist bzw. innerhalb der Fehlertoleranzen nicht gewichtig zu Buche schlägt, was für Partikelgrößen unterhalb $d = 50$ nm erfüllt ist.

Die direkte experimentelle Bestimmung des Rayleigh-Verhältnisses nach Gl. A.6 verlangt genaue Kenntnis des Streuvolumens V und dessen Abstand R vom Detektor, was in der Praxis extrem schwierig zu realisieren ist. Beide Größen müssten im Prinzip für jede verwendete Probe bestimmt werden. Beide experimentellen Schwierigkeiten lassen sich durch die Verwendung von isotrop streuenden Referenzlösungsmitteln als Streustandards, die der Kalibrierung der Apparatur gemäß

$$R(\vec{q}) = \frac{\langle I(\vec{q}) \rangle - \langle I_{Lsm}(\vec{q}) \rangle}{\langle I_{Ref}(\vec{q}) \rangle} \left(\frac{n}{n_{Ref}} \right)^2 R_{Ref} \quad (\text{A.13})$$

dienen, umgehen. Die verwendeten Referenzlösungsmittel waren Toluol und Benzol. Deren Rayleigh-Verhältnisse wurden der Literatur entnommen [Berne and Pecora, 1976].

A.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Brown'sche Molekularbewegung bewirkt, dass die Konzentration der Makromoleküle in Abhängigkeit vom Ort und der Zeit fluktuiert, was anhand des nichtverschwindenden Schwankungsquadrats in Gleichung A.8 schon zum Ausdruck gekommen ist. Die auftretenden Variationen der Konzentration relaxieren gemäß dem Fick'schen Gesetz. Die Eigenschaften der Partikel wie Größe, Form usw. bestimmen, wie schnell die auftretenden Konzentrationsgradienten ausgeglichen werden können. Ein Maß hierfür sind die Relaxationszeiten τ_i , die ausserdem noch von der Temperatur und der Viskosität des Lösungsmittels η abhängen. Als Folge der Konzentrationsschwankungen treten Fluktuationen des Feldes des gestreuten Lichtes auf, welche die äquivalenten Informationen über das Relaxationsverhalten des Systems beinhalten. Mit dem gleichen apparativen Aufbau (Abb. A.1), der bei der SLS Verwendung fand, werden die resultierenden Intensitätsfluktuationen registriert [Gast et al., 1992]. Die zentrale Messgröße ist nicht mehr ein zeitlicher Mittelwert, sondern die Zeitautokorrelationsfunktion (AKF) der Intensität

$$G^{(2)}(\tau) = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{t} \int_{t'}^t I(t)I(t+\tau)dt = \langle I(t')I(t'+\tau) \rangle = \langle I(0)I(\tau) \rangle \quad . \quad (\text{A.14})$$

Da $I(t')$ von der Wahl des Zeitursprungs unabhängig ist, darf t' im letzten Schritt von Gl. A.14 gleich Null gesetzt werden. Die Zeit τ darf nicht mit den charakteristischen Relaxationszeiten τ_i , die den Zerfall der Fluktuationen auf die Gleichgewichtswerte beschreiben, verwechselt werden. In der Praxis wird nur zu diskreten Zeitpunkten gemessen werden, so dass $G^{(2)}$ in diskreter Form mittels eines digitalen Korrelators aufgenommen wird

$$G^{(2)}(m\Delta\tau) = \sum_{j=1}^{N-m} I(\tau_j)I(\tau_{j+m}) \quad , \quad (\text{A.15})$$

wobei $m\Delta\tau$ die Verzögerungszeit ist und N die Anzahl der Messungen bezeichnet. Für sehr kurze Zeiten sind die Signale maximal korreliert, $G^{(2)}(\tau)$ nimmt den größten Wert

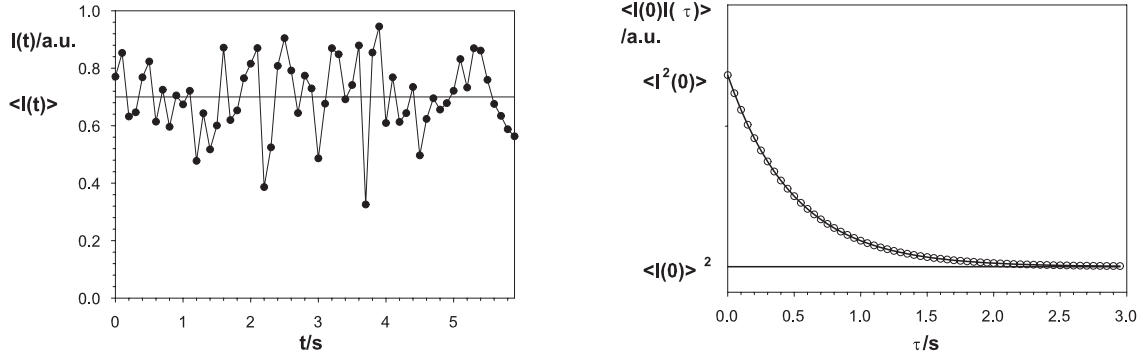


Abbildung A.3: Schematische Darstellung der Intensitätsfluktuationen und dazugehöriger Zeitautokorrelationsfunktion: (Links) typischer Zeitverlauf der gestreuten Intensität $I(t)$, die um den Mittelwert $\langle I(t) \rangle$ fluktuiert. (Rechts) dazugehörige Zeitautokorrelationsfunktion der Intensität, die monoexponentiell mit der Relaxationszeit τ auf das quadrierte Mittel $\langle I(t) \rangle^2$ abfällt.

an. Mit zunehmender Zeit sind die Intensitäten immer schwächer korreliert und fallen im willkürlichen Beispiel von Abbildung A.3 monoexponentiell ab. Im Grenzfall sehr langer Zeiten τ sind die Intensitätsfluktuationen dann völlig unkorreliert und die AKF nimmt das quadrierte Intensitätsmittel an

$$\begin{aligned} \lim_{\tau \rightarrow 0} \langle I(0)I(\tau) \rangle &= \langle I^2(0) \rangle \\ \lim_{\tau \rightarrow \infty} \langle I(0)I(\tau) \rangle &= \langle I(0) \rangle^2 \end{aligned} \quad (\text{A.16})$$

Die AKF $G^{(2)}(\tau)$ ist mit den Feldstärken E des gestreuten Lichtes durch den Zusammenhang

$$G^{(2)}(\tau) = \langle I(0)I(\tau) \rangle = \langle E^*(0)E(0)E^*(\tau)E(\tau) \rangle \quad (\text{A.17})$$

verknüpft. Wir definieren nun die Zeitautokorrelationsfunktion der Feldstärken $G^{(1)}$ zu

$$G^{(1)}(\tau) = \langle E^*(0)E(\tau) \rangle \quad (\text{A.18})$$

Diese ist beim Homodynverfahren zwar nicht direkt messbar, sie hängt aber über die Siegert-Relation

$$G^{(2)}(\tau) = \langle I(\tau) \rangle^2 + |G^{(1)}(\tau)|^2 \quad (\text{A.19})$$

die für Gaußsche Zufallsprozesse Gültigkeit besitzt, mit $G^{(2)}$ zusammen. Die AKF $G^{(1)}$ beinhaltet die gesuchten Informationen bezüglich des Relaxationsverhaltens, und damit über die Transporteigenschaften, des untersuchten Systems. Für eine monodisperse Lösung nahezu sphärischer Makromoleküle nimmt $G^{(1)}$ folgende Gestalt

$$G^{(1)}(\tau) = a_1 e^{-\frac{\tau}{\tau_0}} = a_0 e^{-D_0 q^2 \tau} \quad \text{mit} \quad \tau_0 = D_0 q^2 \quad (\text{A.20})$$

an [Schmitz, 1990]. Das System beinhaltet nur eine Relaxationszeit τ_0 , da die Moleküle als identisch angenommen wurden. Sie steht in direkter Beziehung zum Translationsdiffusionskoeffizienten D_0 der gelösten Polymere, durch den deren diffusives Verhalten charakterisiert wird. Der Proportionalitätsfaktor a_0 ist durch die Rayleigh-Debye-Gans-Näherung A.5 gegeben.

Mittels der Stokes-Einstein-Beziehung

$$R_S = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_0} \quad (\text{A.21})$$

kann der dazugehörige Radius bestimmt werden. R_S wird häufig als Stokes-Radius oder auch als hydrodynamischer Radius bezeichnet. Er kann sich von dem tatsächlichen geometrischen Radius des Moleküls unterscheiden. Proteine binden an ihrer Oberfläche Wasser. Diese Hydratationshülle wird bei der Diffusion mitgeführt und verkleinert den Diffusionskoeffizienten, was in effektiv grösseren hydrodynamisch relevanten Abmessungen resultiert. Falls die Molekülgestalt stark von der sphärischen Form abweicht, ist R_S lediglich ein Parameter, der den äquivalenten Radius der Kugel, die durch den gleichen Diffusionskoeffizienten charakterisiert wird, angibt. Generell ist aber zu berücksichtigen, daß der Diffusionskoeffizient durch intermolekulare Wechselwirkungen aufgrund der endlichen Konzentration der gelösten Makromoleküle beeinflusst werden kann.

Die Transporttheorie der statistischen Mechanik stellt die im ersten Schritt von Gleichung A.22 gezeigte Beziehung zwischen dem Diffusionskoeffizienten D und dem osmotischen Druck Π her, die auch als verallgemeinerte Stokes-Einstein-Beziehung bezeichnet wird [Schmitz, 1990].

$$\begin{aligned} D &\stackrel{1.}{=} \frac{M}{N_A \xi} \left(\frac{\partial \Pi}{\partial c} \right)_{T,V} \stackrel{2.}{=} \frac{k_B T}{\xi} \left\{ 1 + \frac{A_2}{M} c + \frac{A_3}{M} c^2 + \dots \right\} \\ &\stackrel{3.}{=} D_0 \left\{ 1 + \tilde{A}_2 c + \tilde{A}_3 c^2 + \dots \right\} \end{aligned} \quad (\text{A.22})$$

Setzen wir die entsprechende Virialentwicklung des osmotischen Druckes (Gl. A.9) unter Verwendung des Fluktuations-Dissipations-Theorems $D = k_B T / \xi$ [Yamakawa, 1971] ein, erhalten wir mit den entsprechenden Umbenennungen die Virialentwicklung für den Diffusionskoeffizienten. Der zweite Virialkoeffizient \tilde{A}_2 lässt die gleichen Aussagen zu wie im Falle der Virialentwicklung des osmotischen Druckes. Anhand von Gleichung A.22 sehen wir, dass nur durch Extrapolation gegen unendliche Verdünnung der Makromoleküle der unverfälschte Diffusionskoeffizient D_0 und via der Stokes-Einstein-Beziehung die dazugehörige hydrodynamische Abmessung bestimmt werden kann.

Bei polydispersen Lösungen kann die AKF $G^{(1)}(\tau)$ als Summe der Beiträge der einzelnen Molekülsorten i gemäss Gleichung A.20 angesetzt werden

$$G^{(1)}(\tau) = \sum_i a_i e^{-\frac{\tau}{\tau_i}} = \sum_i a_i e^{-D_i q^2 \tau} \quad \text{mit} \quad a_i = \frac{\sin^2 \phi^2 I_0 16 \pi^4 \alpha^2}{\lambda^4 R^2} N_i n_i^2 S_i(\vec{q}), \quad (\text{A.23})$$

wobei N_i die Anzahl der Moleküle der Sorte i bezeichnet. n_i ist die Anzahl der Streuzentren innerhalb des Moleküls der Sorte i . Diese ist für ein Polymer proportional zu dessen Anzahl

an Monomeren, die seine Kette konstituieren, und damit zu dessen Molekulargewicht M_i . In dieser Arbeit wurde fast ausschliesslich zur Auswertung der AKF das Kumulantenverfahren nach Koppel verwendet [Koppel, 1972]. Dieses erlaubt ein systematisches Extrahieren der Momente der Diffusionskoeffizientenverteilung aus Anpassungen an die AKF $G^{(1)}$. Der n te Kumulant K_n ist definiert durch

$$K_n = \left| \frac{\partial^n}{\partial \tau^n} \ln \left(\frac{G^{(1)}(\tau)}{G^{(1)}(0)} \right) \right|_{\tau=0} . \quad (\text{A.24})$$

Der durch den quadrierten Streuvektor dividierte erste Kumulant entspricht dem z-Mittel über alle Diffusionskoeffizienten D_i der i gelösten Molekülsorten

$$\langle D \rangle_z = \frac{K_1}{q^2} = \frac{\sum_i S_i(\vec{q}) c_i M_i^2 D_i}{\sum_i S_i(\vec{q}) c_i M_i^2} \simeq \frac{\sum_i c_i M_i^2 D_i}{\sum_i c_i M_i^2} , \quad (\text{A.25})$$

falls die verschiedenen Streufunktionen $S_i(\vec{q})$ gleich eins gesetzt werden dürfen. Der Einfluss der Streufunktion wurde schon im vorherigen Unterkapitel diskutiert. Von der Verwendung höherer Momente zur Beschreibung der Verteilung der Diffusionskoeffizienten wurde abgesehen, da diese mit anwachsenden Fehlern behaftet sind, die beim dritten Kumulanten schon bis zu 100% des eigentlichen Wertes ausmachen können.

Eine andere Möglichkeit der Auswertung besteht darin, Gleichung A.23 als (diskrete) Laplace-Transformation der Relaxationszeitenverteilung a_i aufzufassen. Ziel ist dann die AKF $G^{(1)}$ einer inversen Laplace-Transformation zu unterziehen, um die Verteilung a_i zu bestimmen. Dabei handelt es sich leider um ein im mathematischen Sinne schlecht gestelltes Problem, das nicht eindeutig lösbar ist. Zur Lösung dieser Klasse von Problemen stehen verschiedene Regularisierungsverfahren zur Verfügung [Press et al., 1992, Provencher, 1982a]. In dieser Arbeit wurde das Fortran-Programm CONTIN von Provencher verwendet [Provencher, 1982b], das die softwaretechnische Umsetzung des in [Provencher, 1982a] beschriebenen Verfahrens darstellt.

B. Spektroskopische Methoden

Ein Hauptcharakteristikum der Fehlfaltung und Amyloidbildung von Proteinen ist die Konformationsumwandlung von α -helikaler und ungeordneter in β -faltblattreiche Sekundärstruktur [Dobson, 2002]. Zur Untersuchung dieser Umwandlungsprozesse wurden die spektroskopischen Methoden des Circular dichroismus (CD) und der Infrarotspektroskopie (IR) verwendet. Beide Methoden sind besonders zum Nachweis von Änderungen der Sekundärstruktur von Proteinen geeignet [Cantor and Schimmel, 1980]. Sie werden auch häufig zur Bestimmung des Absolutgehalts an den jeweiligen Sekundärstrukturelementen eines Proteins herangezogen [Johnson, 1990, Fabian and Mäntele, 2002]. In dieser Arbeit wurden sie ausschließlich zur Verfolgung der spektralen Änderungen im Bezug auf den Ausgangszustand verwendet, um Informationen über die Kinetik der Konformationsübergänge zu erhalten.

Bei allen Formen der Absorptionsspektroskopie wird die in einer Küvette befindliche Proteinlösung mit elektromagnetischer Strahlung der Wellenlänge λ und der Intensität I_0 durchstrahlt. Die verschiedenen spektroskopischen Methoden unterscheiden sich durch den verwendeten Wellenlängenbereich des elektromagnetischen Spektrums und damit durch den physikalischen Effekt, auf dem die Wechselwirkung zwischen dem Wellenfeld und dem Probenmaterial basiert. Mit für die Methode jeweils angepassten Aufbauten und Detektoren wird die durch die Probe durchtretende Intensität I der Strahlung registriert und die Transmission T bestimmt. Daraus kann dann die Absorption A gemäss der Definition B.1 berechnet werden. Die Absorption steht mit den die Probe charakterisierenden Parametern über das Beer'sche Gesetz, das die Grundgleichung jeglicher Absorptionsspektroskopie darstellt, in Beziehung

$$-\ln T = \ln \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} =: A(\lambda) = l \epsilon(\lambda) c \quad , \quad (\text{B.1})$$

wobei l für die Länge der durchstrahlten Kuvette, die sogenannten Schichtdicke, steht. c ist die Konzentration des gelösten Proteins. Die spektralen Eigenschaften des Proteins gehen durch den wellenlängenabhängigen molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon(\lambda)$ ein, der auch das Spektrum des Moleküls genannt wird. Prinzipiell kann dieses quantenmechanisch berechnet werden. Dazu müssen die Wellenfunktionen für den Grundzustand Ψ_0 und die Anregungszustände Ψ_A und deren Energiespektrum mittels der Schrödingergleichung berechnet werden. Dabei müssen die Wechselwirkungsbeiträge, die in den zugehörigen Hamiltonoperator eingehen, exakt bekannt sein. In der Praxis sind die Berechnungen nur für einfachste Moleküle und dann oft auch nur näherungsweise durchführbar. Proteine entziehen sich

aufgrund ihrer Komplexität weitestgehend einer solchen quantitativen Behandlungsweise [Cantor and Schimmel, 1980].

Der Circulardichroismus (CD) beruht auf der Asymmetrie der Moleküle. Seine Grundlage sind im ersten Unterkapitel erläutert. Daran fügen sich die Darstellung der wesentlichen Prinzipien der Infrarotspektroskopie an, die auf der Anregung von Schwingungsfreiheitsgraden innerhalb eines Moleküls fußt. Sie gehört damit zu den Methoden der Schwingungsspektroskopie, die wir in der Ausführung der Fourier-Transforma-Infrarotspektroskopie (FTIR) vorstellen.

B.1 Circulardichroismus

Proteine sind optisch aktive Substanzen. Sie drehen die Schwingungsebene von einfallendem linear polarisierten elektromagnetischen Wellen um einen Winkel ϕ . Dieses Verhalten ist auf molekularer Ebene auf eine asymmetrische Architektur des Moleküls zurückzuführen. Das Molekül kann in zwei Formen vorliegen, die sich wie Bild und Spiegelbild zueinander verhalten, und sich nicht durch Drehungen im Raum ineinander überführen lassen. Diese Eigenschaft wird Chiralität (Händigkeit, gr. cheir=Hand) genannt. Die verschiedenen Aminosäuren, die zur Peptidkette verknüpft werden, sind aufgrund der sie konstituierenden asymmetrischen C-Atome chiral, weshalb das gebildete Protein ebenfalls chiral ist.

Zur Messung des CD wird abwechselnd links- bzw. rechtszirkular polarisiertes Licht auf eine Probe eingestrahlt, das wegen der Chiralität der Proteine unterschiedlich stark absorbiert wird. Die jeweilige Absorption wird gemäss dem Beer'schen Gesetz (Gl. B.1) bestimmt. Der CD ist definiert als die Differenz ΔA zwischen der Absorption A_L der links- bzw. rechtscircularpolarisierten Strahlung A_R

$$\begin{aligned} CD &:= \Delta A(\lambda) = A_L(\lambda) - A_R(\lambda) = (\epsilon_L(\lambda) - \epsilon_R(\lambda))lc = \Delta\epsilon(\lambda)lc \\ &= \theta(\lambda)/(32.99^\circ) \quad . \end{aligned} \quad (\text{B.2})$$

Ein äquivalentes Mass ist die Elliptizität θ . Die Linearkombination der transmittierten Felder resultiert aufgrund der unterschiedlichen Absorptionen für die links- bzw. rechtszirkular polarisierten Wellen in elliptisch polarisierter Strahlung. θ ist als der Arkustangens des Verhältnisses der kleinen zur großen Hauptachse der Ellipse des transmittierten Wellenfeldes definiert [Cantor and Schimmel, 1980].

Zum Auftreten des CD-Effektes müssen zusätzlich zur Chiralität des Moleküls Absorptionsbanden im Spektralbereich der verwendeten Strahlung auftreten, wie aus der Definition (Gl. B.2) hervorgeht. Der CD-Effekt wird quantenmechanisch durch den Ausdruck B.3 für die Rotationsstärke R_{0A} zwischen dem Grundzustand Ψ_0 und dem angeregten Zustand Ψ_A beschrieben

$$R_{0A} = \text{Im} \underbrace{[\langle \Psi_0 | \vec{\mu} | \Psi_A \rangle \cdot \langle \Psi_A | \vec{m} | \Psi_0 \rangle]}_{\neq 0} = \frac{3hc}{8\pi^3 N} \int \frac{[\theta(\lambda)]}{\lambda} d\lambda \quad , \quad (\text{B.3})$$

der durch den Imaginärteil des Skalarprodukts zwischen den Erwartungswerten des elektrischen Dipoloperators $\vec{\mu}$ und des magnetischen Dipoloperators \vec{m} gegeben ist. Die Notwendigkeit des Vorhandenseins einer Absorptionsbande zur Beobachtung eines CD-Effektes kommt durch den Erwartungswert des elektrischen Dipoloperators, der nicht verschwinden darf, zum Ausdruck. Die Asymmetrie der Molekülarchitektur geht durch die Notwendigkeit, dass das Skalarprodukt zwischen den Erwartungswerten der beiden Vektoroperatoren nicht verschwinden darf, ein. Der Erwartungswert des magnetischen Dipoloperators muss eine endliche Komponente in Richtung des elektrischen Dipoloperators besitzen, was nur in chiralen Molekülen gewährleistet ist. Helikale Molekülgeometrien verstärken dies, was die besondere Sensitivität des CDs auf α -helikale Sekundärstrukturelemente von Proteinen begründet [Cantor and Schimmel, 1980].

Ausgeprägte CD-Banden bei Proteinen treten im Bereich deren typischer Absorptionsbanden im fernen Ultravioletten(UV)-Bereich (170 – 250 nm) und im nahen UV-Bereich (250 – 310 nm) auf. Für die Absorption im fernen UV zeichnen sich vor allem die Peptidbindungen aus, worauf der Begriff des Peptid-CDs zurückzuführen ist, und wodurch sich die Sensitivität auf Sekundärstrukturelemente und deren Änderungen erklärt. Der CD des nahen UV-Bereichs wird durch die Absorption der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan und des Disulfidchromophors Cystein dominiert. Veränderungen der lokalen Umgebung dieser Chromophore wirken sich im nahen UV-Spektrum aus, so dass Informationen über Tertiärstrukturänderungen zugänglich werden. Die CD-Banden des nahen UVs sind schwächer ausgeprägt als die im fernen UV [Johnson, 1990].

Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit unterschiedlicher Proben wird die Elliptizität θ auf molare Einheiten bezogen

$$[\theta(\lambda)] = \frac{100 \theta(\lambda)}{l c} \quad , \quad (\text{B.4})$$

dadurch erhält man die molare Elliptizität $[\theta]$. Falls die Konzentration des Proteins in Mol des mittleren Restgewichts angegeben wird, definiert die Gleichung B.4 die mittlere Restelliptizität, die Vergleiche der CD-Spektren unterschiedlicher Proteine erleichtert. Die molare Elliptizität $[\theta]$ lässt sich prinzipiell durch die Rotationsstärke R_{0A} berechnen, was durch Gleichung B.3 zum Ausdruck kommt [Cantor and Schimmel, 1980].

Die CD-Spektren und CD-Kinetiken wurden mit einem J-720 Spektrometer (JASCO, Japan) gemessen. Das CD-Spektrometer wurde mit (+)-10-Camphersulfonsäure bei 290.5 nm und 192.5 nm geeicht [Johnson, 1990]. Die Schichtdicken der verwendeten Küvetten betrugen 0.102 mm oder 1.0 mm. Die verwendeten molaren Restgewichte waren 107.4 für PGK, 113.9 für SHaPrP(90-232) und 113.9 für Barstar.

B.2 FTIR-Spektroskopie

Durch Einstrahlung von elektromagnetischer Strahlung aus dem Bereich des Infraroten (IR) werden Schwingungsfreiheitsgrade von Molekülen angeregt. Der infrarote Spektralbereich umfasst Wellenlängen λ von etwa (2 – 100) μm , was in Wellenzahlen $\nu = 1/\lambda$

ausgedrückt, deren Verwendung in der IR-Spektroskopie üblicher sind, den Bereich von $(5000 - 100) \text{ cm}^{-1}$ umfasst. Das Auftreten und die Intensität von Schwingungsbanden wird durch die elektrische Dipolstärke $D_{\nu\nu'}$ bestimmt

$$\begin{aligned}
 D_{\nu\nu'} &\stackrel{1.}{=} |\langle \psi_0 \phi_\nu | \vec{\mu} | \psi_0 \phi_{\nu'} \rangle|^2 \stackrel{2.}{=} \underbrace{|\langle \psi_0 | (\partial \vec{\mu} / \partial R)_{R_0} | \psi_0 \rangle \times \langle \phi_\nu | \vec{R} | \phi_{\nu'} \rangle|^2}_{\neq 0} \\
 &\stackrel{3.}{=} 9.180 \times 10^{-3} \int \frac{\epsilon(\nu)}{\nu} d\nu \quad (\text{debye})^2 \quad .
 \end{aligned} \tag{B.5}$$

Im ersten Schritt wurde der Produktansatz $\Psi_\nu = \psi_0 \phi_\nu$ für die Gesamtwellenfunktion, wodurch die Bewegungen der Elektronen und Kerne gemäss der Born-Oppenheimer-Näherung voneinander separiert werden, in die Definition für $D_{\nu\nu'}$ eingesetzt. Der elektronische Anteil, der sich bei einem Schwingungsübergang nicht ändert, wird durch die elektronische Grundzustandswellenfunktion ψ_0 beschrieben. Die Wellenfunktionen ϕ_ν und $\phi_{\nu'}$ beschreiben die Vibrationszustände, zwischen denen der Übergang stattfindet. Der elektrische Dipoloperator wurde im zweiten Schritt um die Gleichgewichtslage der Kernposition R_0 in eine Taylorreihe entwickelt. Die nullte Ordnung der Entwicklung verschwindet aufgrund der ungeraden Symmetrie des elektronischen Erwartungswerts. Allerdings würde die nullte Ordnung auch wegen der Orthogonalität der Vibrationswellenfunktionen ϕ_ν und $\phi_{\nu'}$ nichts beitragen. Nur die erste Ordnung der Entwicklung muss, wie in Gl. B.5 aufgeführt, berücksichtigt werden. Sie ergibt sich als Betragsquadrat des Produktes aus dem elektronischen Erwartungswert der Änderung des Dipoloperators und dem Erwartungswert des Vibrationsübergangs. Es lässt sich somit ablesen, dass ein Vibrationsübergang nur bei Änderung des elektrischen Dipolmomentes auftreten kann. Symmetrische Schwingungen bei symmetrischer Molekülarchitektur, wie z.B. die symmetrischen Streckschwingung des CO_2 , bei denen folglich das Dipolmoment erhalten bleibt, sind IR-inaktive Vibrationsmoden, die nicht angeregt werden können. Im dritten Schritt von Gl. B.5 ist der prinzipielle Zusammenhang zwischen Extinktion und der Dipolstärke gegeben, der bei der Berechnung der Infrarotspektren von Molekülen zugrundegelegt wird. Ein Molekül, das aus N Atomen besteht, besitzt nach Abzug der drei Translations- und Rotationsfreiheitsgrade $3N - 6$ Schwingungsfreiheitsgrade (bei linearen Molekülen sind es $3N - 5$). Für Proteine sind die Anzahl der anregbaren Schwingungsmoden und die sich damit ergebenden rechnerischen Schwierigkeiten zu groß, um mittels Gl. B.5 tatsächliche Bandenlagen und Spektren berechnen zu können. Dies wurde nur für Modellsustanzen und Peptide durchgeführt.

Klassische dispersive IR-Spektrometer verfügen über eine breitbandige IR-Lichtquelle und einen Monochromator, der die IR-Strahlung mittels eines Gitters oder Prismas als dispersivem Element in seine spektralen Bestandteile zerlegt. Zur Messung eines Spektrums wird die Absorption bei jeder Wellenlänge nacheinander einzeln aufgenommen. Das Herzstück der modernen FTIR-Spektrometer ist ein Michelson-Interferometer, das den Monochromator der dispersiven IR-Spektrometer ersetzt. Dies hat die folgenden Vorteile:

- **Multiplexvorteil**

Ein Interferogramm enthält die gesamte Information, die zur Kenntnis des Absorp-

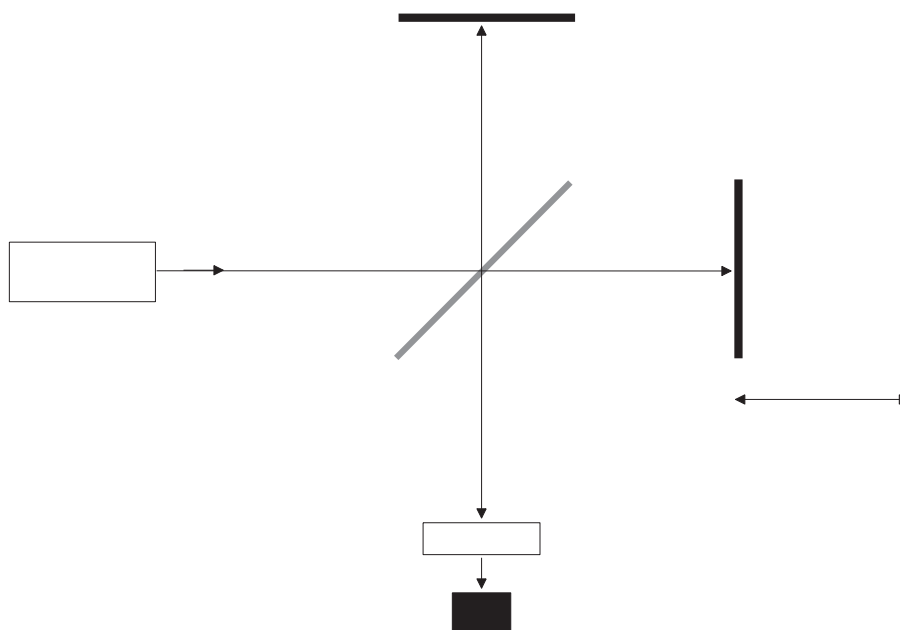


Abbildung B.1: Michelson-Interferometer

tionsspektrums notwendig ist. Das führt bei der Messung zu einer enormen Zeiterparnis.

- **Jacquiotvorteil**

Da FTIR-Spektrometer keine dispersiven Elemente enthalten, verfügen sie über eine wesentlich größere Lichtintensität mit der die Probe durchstrahlt werden kann, was das Signal-zu-Rausch-Verhältniss verbessert.

- **Connesvorteil**

Die Position des beweglichen Spiegels des Michelson-Interferometers lässt sich über die Interferenz der Linie eines Helium-Neon-Lasers jederzeit sehr präzise bestimmen, womit eine sehr genaue Wellenzahlkalibrierung (0.001 cm^{-1}) gewährleistet werden kann.

Der prinzipielle Aufbau des Spektrometers ist in Abbildung B.1 dargestellt. Ausgehend von der IR-Quelle trifft die IR-Strahlung auf einen Strahlteiler in Form eines halbdurchlässigen Spiegels, der im Idealfall exakt 50% reflektierend bzw. transmittierend ist. Die beiden Teilstrahlen treffen dann auf vollständig reflektierende Spiegel, wovon einer beweglich ist. Die beiden zurückreflektierten Teilstrahlen interferieren miteinander in Abhängigkeit ihrer Phasendifferenz δ am Strahlteiler. Die Phasendifferenz hängt von der unterschiedlichen Länge des zurückgelegten Weges und damit von der Position des beweglichen Spiegels ab. Bei der in Abb. B.1 gezeigten Stellung ist die Phasendifferenz gleich Null. An der

Position x gilt $\delta = 2x$. Die Hälfte der interferierenden Strahlung wird in Richtung der Probe reflektiert, durchtritt diese und trifft auf den Detektor. Die in Abhängigkeit von der optischen Wegdifferenz nachgewiesene Intensität bezeichnet man als Interferogramm $I(x)$. Nach Abzug der Basislinie bei Verwendung einer breitbandigen IR-Quelle mit der Ausgangsintensität I_0 nimmt das Interferogramm $I(x)$ die Form

$$I(x) = \int \frac{I(\nu)}{2} \cos(2\pi\nu \cdot x) d\nu \quad (\text{B.6})$$

an [Griffiths, 1975]. Das Interferogramm ist also die (Cosinus)Fouriertransformierte des Intensitätsspektrums $I(\nu)$ der untersuchten Probe. Durch Rücktransformation von $I(x)$ unter Zuhilfenahme der diskreten Fouriertransformation kann $I(\nu)$ berechnet werden, woraus sich dann mittels I_0 und der Gl. B.1 die Transmission T und damit das Absorptionsspektrum bestimmen lassen. Es bestehen über das hier Geschriebene hinaus vielfältige Datenaufbereitungsmethoden und Verfahren die verschiedene Unzulänglichkeiten, die hier stillschweigend vernachlässigt wurden, zu berücksichtigen. Da das den hier gesteckten Rahmen deutlich übersteigen würde, verweisen ich auf die Literatur [Griffiths, 1975].

Proteine besitzen neun breite IR-Banden. Die Banden, die aufgrund der Schwingungen des Proteinrückgrats zustandekommen, werden als Amidbanden bezeichnet. Für diese Arbeit sind nur die Amid-I- und Amid-II-Bande von Bedeutung. Erstere resultiert hauptsächlich aus der CO-Streckschwingung und liegt im mittleren IR zwischen Wellenzahlen von $(1610 - 1695) \text{ cm}^{-1}$. Die NH-Biegeschwingung und NH-Streckschwingung der Peptidkette verursachen die Amid-II-Bande, die zwischen $(1480 - 1575) \text{ cm}^{-1}$ auftritt [Fabian and Mäntele, 2002].

Sekundärstruktur	Wellenzahl der Amid-I-Schwingung	Wellenzahl der Amid-II-Schwingung
Antiparalleles β -Faltblatt	1685(w), 1668(vw), 1632(s)	1550(w), 1530(s), 1510(w)
Paralleles β -Faltblatt	1648(w), 1632(s)	1550(w), 1530(s)
α -Helix	1650(s), 1646(w)	1546(s), 1516(w)
β - und γ -Turns	1660-1770	keine Angaben
ungeordnete Strukturen	1658	1520

Tabelle B.1: Theoretische Wellenzahlen von Amid-I- und Amid-II-Schwingungen der Peptidbindung in verschiedenen Konformationen nach [Krimm, 1962]. Die Wellenzahlen sind in cm^{-1} angegeben. w - schwach ; vw - sehr schwach; s - stark.

Experimentell beobachtete Amidbanden entstehen aus der Superposition der entsprechenden Vibrationsmoden der einzelnen Peptideinheiten. Die genaue Energie einer einzelnen Schwingung und die damit verbundene Wellenzahl, bei der die Bande auftritt, hängen

von einer Vielzahl von Faktoren ab, wie den Atommassen benachbarter Gruppen, mechanische Kopplungen, Symmetrie, Elektronegativität etc.. Den dominierenden Faktor bei IR-Spektren stellen Wasserstoffbrücken dar, die sowohl intra- als auch intermolekular gebildet werden können. Die jeweils charakteristische Kopplung der verschiedenen Sekundärstrukturelemente durch Wasserstoffbrücken erklärt, warum die Amid-I- und Amid-II-Bande Informationen über die Sekundärstruktur von Proteinen beinhalten. Die Lagen der Banden ausgezeichneter Sekundärstrukturelemente sind in Tabelle B.1 zusammengefasst. Die Werte der Wellenzahlen wurden durch störungstheoretische Berechnungen von Modellpeptiden gewonnen [Krimm, 1962]. Durch die spezielle Tertiärstruktur mancher Proteine können durchaus Abweichungen von den berechneten Werten auftreten.

Die HOH-Deformationsschwingung von Wasser bei $\nu = 1645 \text{ cm}^{-1}$ überlagert sich teilweise mit der Amid-I-Bande des untersuchten Proteins. Dadurch erweist es sich als günstiger D_2O -Medien zu benutzen, um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern. D_2O absorbiert aufgrund des Isotopeneffektes nicht in diesem Bereich. Analog der Formel für die Frequenz ω des klassischen Oszillators

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad , \quad (\text{B.7})$$

wobei k die Federkonstante ist, die der Stärke einer Molekülbindung entspricht, hängt die Frequenz einer Vibrationsschwingung von den Massen der beteiligten Kerne, die in die reduzierte Masse μ des Oszillators eingehen, ab. Durch Verwendung von Isotopen kann die Frequenz der Schwingung verschoben werden. Aufgrund des H/D-Austausches des Proteinrückgrates werden die Amidbanden verschoben. Die Amid-I-Bande wird nur schwach um etwa $(5 - 10) \text{ cm}^{-1}$ zu niedrigeren Wellenzahlen hin verschoben. Die Auswirkungen sind drastischer auf die Amid-II-Bande, die um 100 cm^{-1} in den Bereich von $\nu = 1450 \text{ cm}^{-1}$ verschoben wird.

C. Reaktionen in Lösungen

Lange Zeit war das eigentliche Wesen der Proteine Gegenstand einer heftigen Auseinandersetzung, des sogenannten Kolloid/Makromolekül-Disputes [van Holde, 2003]. Im Jahre 1902 hatte Hofmeister mit erstaunlichem Weitblick Proteine als über Amidbindungen verknüpfte Aminosäuren erkannt, was in der von ihm formulierten Peptidhypothese zum Ausdruck kommt [Hofmeister, 1902]. Die für Eiweiße gefundenen hohen Molekulargewichte von 12000 – 15000 ließen aber Zweifel an deren molekularen Charakter aufkommen [van Holde, 2003]. Die Hypothese von Makromolekülen musste erst noch von Staudinger 1920 aus der Taufe gehoben werden [Staudinger, 1920]. So nahm Svedberg im Jahre 1924 noch an, dass Proteine Aggregate aus kolloiden Partikeln wären. Letztendlich lieferte er selbst mit der Erfindung der Ultrazentrifuge und seinen darauf aufbauenden Studien die Methode und die klarsten Beweise zum Nachweis des makromolekularen Aufbaus von Proteinen [van Holde, 2003].

Nichtsdestotrotz ist ein gewisser kolloidaler Charakter Proteinen nicht abzusprechen. Dieser äussert sich zwar nicht in ihrer nativen Struktur und der damit verbundenen Funktion, sondern vielmehr in ihrer Aggregation, die Folge der Denaturierung der nativen Struktur ist [Jaenicke and Seckler, 1997]. In der Kolloidchemie wird die Aggregation von Kolloidteilchen Koagulation genannt. Die erste Theorie der Koagulation stellte von Smoluchowski im Jahr 1916 auf [Smoluchowski, 1916, Smoluchowski, 1917]. Gleichzeitig schuf er mit diesen Arbeiten die Grundlagen zur Beschreibung chemischer Reaktionen in Lösungen. Diese Kollisionstheorie in Lösung wird im ersten Unterkapitel vorgestellt. Daran schließt sich die Darstellung der Smoluchowski-Koagulationstheorie an. Im Vergleich dazu wird den Konsequenzen irreversibler Aggregation, die nur durch sequentielle Addition von Monomeren stattfindet, auf den Grund gegangen. Die Entdeckung des Konzeptes der fraktalen Geometrie belebte das Studium der Aggregation von Kolloiden zu Beginn der achtziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts wieder. Im Zuge dieser Untersuchungen wurden Verfeinerungen der ursprünglichen Koagulationstheorie entwickelt, die im vierten Unterkapitel erklärt werden [Vicsek, 1992]. Der letzte Abschnitt ist dem Diffusions-Kollisions-Modell der Proteinfaltung gewidmet [Karplus and Weaver, 1976]. Wie wir sehen werden, sind in ihm sehr stark Konzepte der Kolloidaggregation verarbeitet, die bei flüchtiger Betrachtung mit einem Augenzwinkern als Reminiszenz an den Kolloid/Makromolekül-Disput angesehen werden können.

C.1 Kollisionstheorie in Lösungen

In wässrigem Milieu vollziehen Proteine aufgrund der zufälligen Stöße mit den Molekülen des Lösungsmittels Brown'sche Bewegungen. In seinen Göttinger Vorträgen im Jahre 1916 wies von Smoluchowski darauf hin, dass die Diffusion das Resultat dieser ungestörten Brown'schen Bewegung der einzelnen Teilchen ist [Smoluchowski, 1916]. Die Äquivalenz der Brown'schen Bewegung zum Diffusionsmechanismus erlaubt für die Zeitskala, auf der sich die Bewegung des Makromoleküls vollzieht, die Fick'schen Gesetze zur quantitativen Beschreibung heranzuziehen, da die Zeitskala auf der die Stöße mit den Molekülen des Lösungsmittels stattfindet wesentlich kleiner ist [Chandrasekhar, 1943]. Ein Konzentrationsgradient $\text{grad } n$ zieht gemäß dem ersten Fick'schen Gesetz einen Teilchenfluss \vec{J} nach sich, der versucht das Konzentrationsgefälle auszugleichen und diesem folglich entgegengerichtet ist

$$\vec{J} = -D \text{grad } n \quad , \quad (\text{C.1})$$

wobei $n = N/V$ die Zahlkonzentration ist und N die Gesamtzahl der Makromoleküle im betrachteten Volumen V bezeichnet [Moore and Pearson, 1981]. Das erste Fick'sche Gesetz diente als Definitionsgleichung für den Diffusionskoeffizienten D , bevor der Zusammenhang zur Brown'schen Bewegung entdeckt wurde. Die Teilchenzahl N ist eine Erhaltungsgröße

$$\frac{\partial n}{\partial t} \stackrel{!}{=} -\text{div} \vec{J} \stackrel{!}{=} D \Delta n \quad , \quad (\text{C.2})$$

weswegen für die Zahlkonzentration n die Kontinuitätsgleichung gilt, die den ersten Schritt von Gleichung C.2 darstellt. Einsetzen des ersten Fick'schen Gesetzes führt im zweiten Schritt zur Diffusionsgleichung, die auch als zweites Fick'sches Gesetz bezeichnet wird [Moore and Pearson, 1981]. Das Symbol Δ steht dabei für den Laplaceoperator [I.N.Bronstein and K.A.Semendjajew, 1989].

Ausgehend von den beiden Fick'schen Gesetzen betrachtete von Smoluchowski die in Abbildung C.1 dargestellte Situation. Das Teilchen i mit Radius R_i ruht im Ursprung. Das Partikel j mit Radius R_j ist der Brownschen Bewegung unterworfen. Falls das Teilchen j in die Wirkungssphäre R des Teilchens i eindringt, wird angenommen, dass die beiden Partikel miteinander reagieren und als Konsequenz daraus, das Partikel j vernichtet wird. Mathematisch bedeutet das, die Diffusionsgleichung C.2 mit der Randbedingung $n(R, t) = 0$ zu lösen. Dabei kann die Kugelsymmetrie des Problems ausgenutzt werden, die nur die Berücksichtigung des Radialanteils des Laplaceoperators und damit der Diffusionsgleichung erlaubt

$$\frac{\partial n(r, t)}{\partial t} = D \left\{ \frac{\partial^2 n(r, t)}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial n(r, t)}{\partial r} \right\} \quad . \quad (\text{C.3})$$

Die Lösung des Radialanteils der Diffusionsgleichung C.3 mit der obengenannten Randbedingung lautet

$$n(r, t) = n_0 \left[1 - \frac{R}{r} \text{erfc} \left(\frac{r - R}{\sqrt{4Dt}} \right) \right] \quad \text{mit} \quad \text{erfc}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_x^\infty e^{-z^2} dz \quad , \quad (\text{C.4})$$

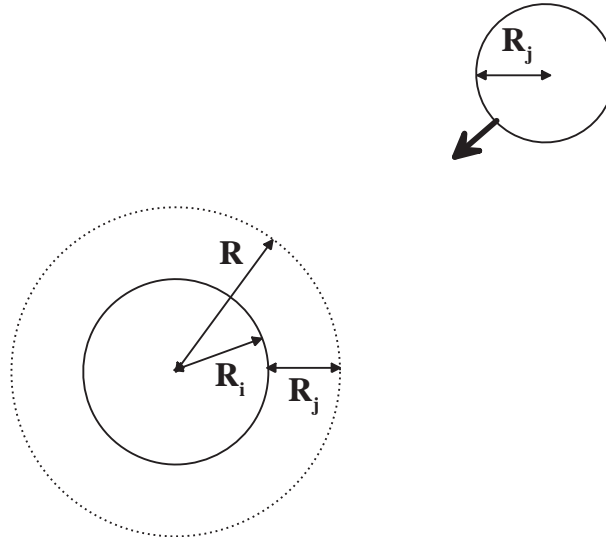


Abbildung C.1: Diffusion von Molekül j zu Molekül i , das fest verankert und damit stationär ist.

wobei n_0 die anfängliche Teilchenzahlkonzentration der diffundierenden Moleküle von der Sorte des Partikels j mit Radius R_j ist. Der Betrag des Teilchenfluss J durch die Oberfläche der Wirkungssphäre R des Partikels i im Ursprung ergibt sich durch Einsetzen von Gl. C.4 in Gl. C.1 zu

$$J = 4\pi R^2 D \left. \frac{\partial n(r, t)}{\partial r} \right|_{r=R} = 4\pi D R n_0 \left[1 + \frac{R}{\sqrt{\pi D t}} \right], \quad (\text{C.5})$$

was gleichzeitig der Reaktionsrate des Partikels i mit den Teilchen j entspricht. Für hinreichend große Zeiten kann der zeitabhängige Anteil vernachlässigt werden

$$t \gg \frac{R^2}{\pi D} = \frac{(4.2\text{nm})^2}{\pi \cdot 5.11 \cdot 10^{-11} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}} = 0.11\mu\text{s} \quad ,$$

und der Fluss J wird stationär. Das Zahlenbeispiels kommt unter Verwendung der Werte für das Edukt der Amyloidbildungsreaktion von PGK zustande, die in Kapitel 2.2 diskutiert werden, und zeigt, dass die Annahme der Stationarität bis in den Bereich von Mikrosekunden gerechtfertigt ist.

Unter realistischen Bedingungen muss die Relativbewegung der Partikel i und j berücksichtigt werden, und das Teilchen i kann nicht mehr als im Ursprung fixiert angenommen werden. In diesem Fall muss der Diffusionskoeffizient D durch die Summe der Diffusionskoeffizienten der beiden Teilchen i und j ersetzt werden [Smoluchowski, 1917]. Die Summe der einzelnen Radien bestimmt den Radius der Wirkungssphäre für die Reaktion zwischen beiden Teilchen. Die Ratenkonstante $K_{i,j}$ für die diffusionskontrollierte Reaktion zwischen den Partikel i und j ist dann schließlich durch

$$k_{i,j} = 4\pi(D_i + D_j)(R_i + R_j) \quad (\text{C.6})$$

gegeben.

Die hier vorgestellte Ableitung, die der ursprünglichen Smoluchowskischen nachempfunden ist, besitzt zwei Mängel, auf die Collins und Kimball erstmalig hinwiesen [Collins and Kimball, 1949]. Erstens ist der Fluss J in Gl. C.5 für $t = 0$ divergent, was einer höchst unphysikalischen Situation entspricht. Zweitens ist die Natur des Konzentrationsgradienten, der durch die Forderungen der Randbedingung $n(R, t) = 0$ und nach einer mittleren Konzentration n_0 außerhalb der Wirkungssphäre geschaffen wird, und der die eigentliche Triebfeder der Reaktion gemäß dem ersten Fick'schen Gesetz bildet, höchst unklar. Collins und Kimball gelang es durch Modifikation der Randbedingung auf der Wirkungssphäre, die obengenannten Ungereimtheiten zu beseitigen und die generelle Gültigkeit des Ausdruckes Gl. C.6 für diffusionskontrollierte, bimolekulare Reaktionen nachzuweisen [Collins and Kimball, 1949]. Ein weiterer Fortschritt bestand darin, dass sie den Ausdruck für die Ratenkonstante verallgemeinerten. Eine Reaktion verläuft nur dann diffusionskontrolliert, wenn die Ratenkonstante k_{chem} der eigentlichen chemischen Reaktion, die an der Oberfläche der Wirkungssphäre stattfindet, wesentlich größer als $K_{i,j}$ ist und somit zu annähernd hundert Prozent zur Transmission in den reagierten Zustand führt. Andernfalls ist k_{chem} im Ausdruck für die Ratenkonstante k der gesamten Reaktion durch

$$k = \frac{k_{chem}}{1 + \frac{k_{chem}}{K_{i,j}}} \quad (C.7)$$

zu berücksichtigen [Collins, 1950, Laidler, 1987]. Von Smoluchowski hatte schon einen Wahrscheinlichkeitsfaktor α in Gl. C.6 eingeführt, um das Regime der langsamen Koagulation von Kolloiden beschreiben zu können, bei dem nur ein Bruchteil der Stöße zur Vereinigung der Kolloidteilchen führt [Smoluchowski, 1917]. Dieses Vorgehen führt zu Inkonsistenzen, da der Fluß durch die Wirkungssphäre nicht mehr der Abnahme der Reaktanten entspricht (vgl. Gl. C.5) [Collins and Kimball, 1949]. Die Klebewahrscheinlichkeit α wird daher besser unter Verwendung von Gl. C.7 definiert

$$\alpha := k/k_s \quad \text{mit} \quad k_s = \frac{8 k_B T}{3 \eta} \quad . \quad (C.8)$$

Dabei ist k_s die sogenannte Smoluchowski-Ratenkonstante, die man durch Einsetzen der Stokes-Einstein-Beziehung (Gl. A.21) in die Ratenkonstante für diffusionskontrollierte Reaktionen (Gl. C.6) unter der Annahme gleich großer kugelförmiger Teilchen erhält. Sie markiert die theoretische Obergrenze für Ratenkonstanten bimolekularer Reaktionen. Für $k_{i,j} \gg k_{chem}$ reduziert sich die Ratenkonstante Gl. C.7 zu $k = k_{chem}$. Die Reaktion findet dann im sogenannten reaktionskontrollierten Regime statt. Dieses Regime zeichnet sich durch geringe Klebewahrscheinlichkeiten aus ($\alpha \ll 1$). Hingegen sind diffusionskontrollierte Reaktionen durch hohe Klebewahrscheinlichkeiten nahe eins charakterisiert ($\alpha \approx 1$).

C.2 Smoluchowski-Koagulationstheorie

Ausgehend von der Ratenkonstante Gl. C.6 entwickelte von Smoluchowski eine Theorie der Koagulationkinetik kolloider Lösungen [Smoluchowski, 1917]. Dabei wird die Kinetik der

Aggregation der Kolloidteilchen als Kaskade parallel ablaufender bimolekularer Reaktionen beschrieben. Die Grundannahmen des Smoluchowski-Ratengleichungsansatzes sind:

- Die Ratenkonstante $k_{i,j}$ für die Aggregation zweier Oligomere, die aus i und j Monomeren zusammengesetzt sind, ist gleich. Die Ratenkonstante ist symmetrisch $k_{i,j} = k_{j,i}$. Sie stellt ein Konfigurations- und Orientierungsmittel für die exakte Reaktionsrate eines Oligomerpaares, das mit einer spezifischen Konfiguration unter einer bestimmten gegenseitigen Orientierung miteinander reagiert, dar.
- Die Bindung zwischen zwei Oligomeren, die durch deren Reaktion entsteht, wird als untrennbar angesehen. Der Wachstumsprozess ist deshalb irreversibel.
- Die Zahlkonzentration n_i der Oligomere, die aus i Monomeren bestehen kann durch ihren räumlichen Mittelwert beschrieben werden. Die Ortsabhängigkeit aller Größen wird demzufolge vernachlässigt, weshalb der Smoluchowski-Ratengleichungsansatz eine Molekularfeldtheorie darstellt.
- Die Lösung ist hinreichend verdünnt, so dass die Reaktionsrate $k_{i,j}$ zwischen zwei Oligomeren nicht durch die Anwesenheit von anderen Aggregaten beeinflusst wird. Konsequenterweise werden Reaktionen, die drei und mehr Reaktionspartner involvieren, nicht berücksichtigt.

Mit diesen Annahmen erhält man die Smoluchowski-Koagulationsgleichung durch die Bilanzierung der Zu- und Abnahmen der Besetzungszahlen n_k aufgrund der Kollisionen. Sie lautet

$$\frac{d}{dt}n_k(t) = \frac{1}{2} \sum_{i+j=k}^{\infty} k_{i,j} n_i(t) n_j(t) - n_k(t) \sum_{j=1}^{\infty} k_{k,j} n_j(t) \quad . \quad (\text{C.9})$$

Der erste Term der rechten Seite beschreibt die mittlere Rate, mit der Oligomere bestehend aus k Primärteilchen durch die Reaktion von i -meren mit j -meren gebildet werden. Der zweite Term repräsentiert die Abnahme der k -mere durch die Bindung an j -mere und damit durch Bildung größerer Aggregate. Die Ratenkonstanten $k_{i,j}$ enthalten die gesamten physikochemischen Informationen über den Aggregationsmechanismus.

Die Modellierung des Koagulationsprozesses reduziert sich nun darauf, plausible Ratenkonstanten $k_{i,j}$ zu finden. Das Hauptproblem besteht darin, die Abhängigkeit der Reaktivität der Partikel mit deren wachsender Größe einzubeziehen. Eine populäre Möglichkeit besteht in der Annahme von Skalengesetzen für den geometrischen Radius R_i und den Diffusionskoeffizienten D_i der Aggregate, die aus i Primärteilchen (Monomeren) zusammengesetzt sind:

$$R_i = R_1 i^{1/d_f} \quad \text{und} \quad D_i = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_{S,i}} = \frac{k_B T i^{-1/d_h}}{6\pi\eta R_{S,1}} \quad . \quad (\text{C.10})$$

Dabei bezeichnen R_1 und $R_{S,1}$ den geometrischen bzw. den hydrodynamischen Radius des Monomers. Falls die Skalengesetze Gl. C.10 nur für einen eng beschränkten Bereich

von Werten für i gelten, spricht man von „Potenzgesetzaggregaten“ [Friedlander, 2000]. Die Aggregate heißen Fraktale, wenn der Größenbereich mehrere Dekaden umschließt. Die Exponenten d_f und d_h charakterisieren die geometrischen und hydrodynamischen Eigenschaften der Aggregate und werden für die letzteren fraktale Dimensionen genannt [Mandelbrot, 1983]. Einsetzen der Skalengesetzen Gl. C.10 in die Ratenkonstante für diffusionskontrollierte Reaktionen Gl. C.6 führt auf die Brown'sche Ratenkonstante für Fraktale

$$k_{i,j}^{fractals} = \frac{R_1}{R_{S,1}} \frac{k_s}{4} (i^{1/d_f} + j^{1/d_f}) (i^{-1/d_h} + j^{-1/d_h}) \quad . \quad (C.11)$$

In der Physik wird von $k_{i,j}$ häufig auch von dem Aggregationskern oder der Kernfunktion gesprochen. Bei den meisten Studien in den Kolloidwissenschaften kann $\rho = R_1/R_{S,1} = 1$ angenommen werden [Kyriakidis et al., 1997]. Für globuläre Proteine fällt ρ etwa in den Bereich $0.775 \leq \rho \leq 1.51$, wobei die untere Grenze den Wert für die dichteste Kugelpackung angibt. Der Wert der oberen Grenzen wird durch ein Protein, das näherungsweise die Konformation eines Zufallsknäuel einnimmt, erreicht [Gast et al., 1994].

Analytische Lösungen der Koagulationsgleichung C.9 sind nur für eine sehr beschränkte Anzahl von Kernfunktionen bekannt [Ziff, 1984]. Darunter ist die Lösung für eine größenunabhängige und damit konstante Kernfunktion $k_{const.} = \alpha k_s$ unter der Annahme monodisperser Anfangsbedingungen $n_k(0) = \delta_{1,k}$ ⁱ die bedeutendste [Smoluchowski, 1917]

$$n_k(t) = \frac{n_1(0)(t/t_c)^{k-1}}{(1+t/t_c)^{k+1}} \quad \text{mit} \quad t_c = \frac{2}{\alpha k_s n_1(0)} \quad , \quad (C.12)$$

wobei t_c die Koagulationszeit ist. Das normierte Gewichtsmittel der Aggregate M_{rel} , das direkt mit der statischen Lichtstreuung gemessen werden kann (vgl. Anhang A), ergibt sich dann zu [Overbeek, 1952]

$$M_{rel}(t) = \frac{\bar{n}_{const.}(t)}{n_1(0)} = \sum_{k=1}^{\infty} k^2 \frac{n_k(t)}{n_1(0)} = (1 + 2t/t_c) \quad . \quad (C.13)$$

Die Smoluchowski-Koagulationsgleichung C.9 wurde numerisch mit dem Programm MATHEMATICA für fraktale Kernfunktionen C.11 gelöst [Wolfram, 2001]. Die obere Ausschlussgröße, bis zu der das Differentialgleichungssystem C.9 gelöst wurde, betrug $k = 50$. Die Ergebnisse waren in den betrachteten Zeiträumen davon unbeeinflusst, was durch Variation von k sichergestellt wurde. Die normierte Abweichung Δ der numerischen Lösungen für M_{rel} von der analytischen Lösung für konstante Ratenkonstanten $\Delta = (\bar{n}_{Fraktal}(t) - \bar{n}_{const.}(t)) / \bar{n}_{const.}(t)$ ist in Abbildung C.2A für verschiedene Werte der Exponenten d_f und d_h aufgetragen. Die Abweichungen liegen für Zeiten, die das vier- bis fünffache der Koagulationszeit betragen, unterhalb von 6%. Die konstante Kernfunktion dient daher als überzeugende Näherung für Brownsche Kernfunktionen Gl. C.11. Die Brownschen Kernfunktionen hängen nur schwach von der fraktalen und hydrodynamischen Dimension ab, was die breite Verwendung der konstanten Kernfunktion erklärt [Odriozola et al., 1999].

ⁱ $\delta_{j,k}$ bezeichnet das Kronecker-Symbol: $\delta_{j,k} = 1$ für $k = j$ und sonst 0

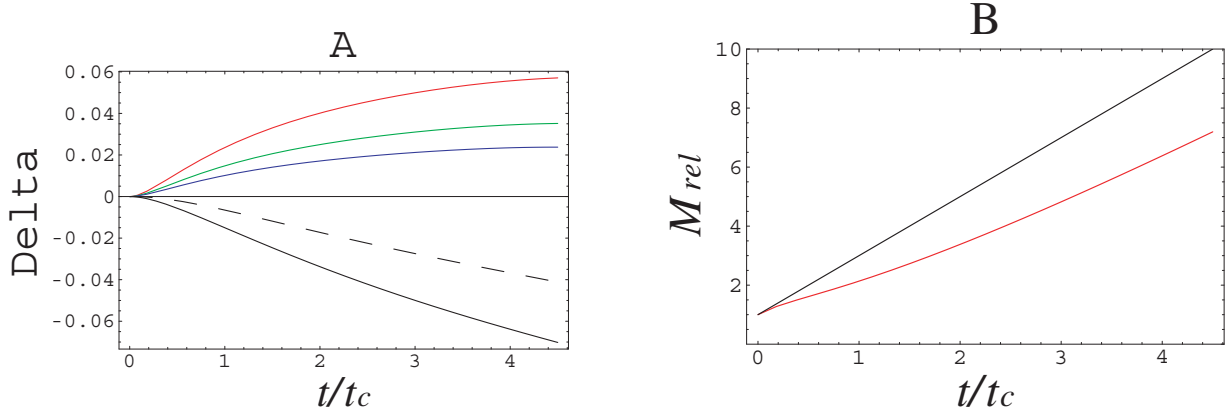


Abbildung C.2: Numerische Untersuchungen zur Smoluchowski-Koagulationstheorie. A Abweichung Δ der analytischen Lösung von Lösungen unter Verwendung fraktaler Ratenkonstanten. rot: $d_f = d_h = 2$, grün: $d_f = d_h = 2.5$, blau: $d_f = d_h = 3$, gestrichelt: $d_f = 2.5$ und $d_h = 2.2$, schwarz: $d_f = 2.5$ und $d_h = 2$. B schwarz: M_{rel} für gewöhnliche Koagulation mit gleichen Ratenkonstanten (Gl. C.13), rot: Mechanismus bei dem Monomere nur zu Dimeren reagieren. Die weitere Reaktionskaskade wird dann von den Dimeren durchlaufen.

In Abbildung C.2B ist die Zeitentwicklung des normierten Gewichtsmittels M_{el} für einen Aggregationsmechanismus gezeichnet, bei dem nur intermediäre Oligomere n_k , die aus einer geraden Anzahl k von Monomeren zusammengesetzt sind, gebildet werden. Formal gilt dann die Koagulationsgleichung C.9 nur für gerade i, j, k , wobei aber der Wert eins mit eingeschlossen werden muss. Monomere verbinden sich zu Dimeren, die im weiteren Verlauf dann die Grundbausteine für alle weiteren Aggregate bilden, wobei auch Tetramere mit Tetrameren usw. reagieren können. Die Ratenkonstanten wurden bei der numerischen Simulation größenunabhängig angesetzt. Die Obergrenze für k war fünfzig. M_{rel} wächst im Vergleich zum gewöhnlichen Koagulationsmechanismus, bei dem k auch ungerade sein darf, wesentlich langsamer an. Die Verläufe sind deutlich voneinander unterscheidbar.

C.3 Sequentielle Monomeraddition

Eine andere Möglichkeit der Aggregation und damit des Wachstums besteht in der sequentiellen Addition von Monomeren an Oligomere. Die Vereinigung von Oligomeren ist bei diesem Mechanismus verboten. Die sequentielle Monomeraddition wird durch das Gleichungssystem

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}n_1(t) &= -k_{1,1}n_1^2(t) - n_1(t) \sum_{j=1}^{\infty} k_{1,j}n_j(t) \\ \frac{d}{dt}n_k(t) &= k_{1,k-1}n_1(t)n_{k-1}(t) - k_{1,k}n_1(t)n_k(t) \end{aligned} \quad (\text{C.14})$$

beschrieben [Jossang et al., 1985, Speed et al., 1997]. Die sonstigen Annahmen sind die gleichen, die zur Ableitung der Smoluchowski-Koagulationstheorie vorausgesetzt werden. Dazugehörige Gewichtsmittel M_{rel} sind in Abbildung C.3 dargestellt. Die genaue Form der

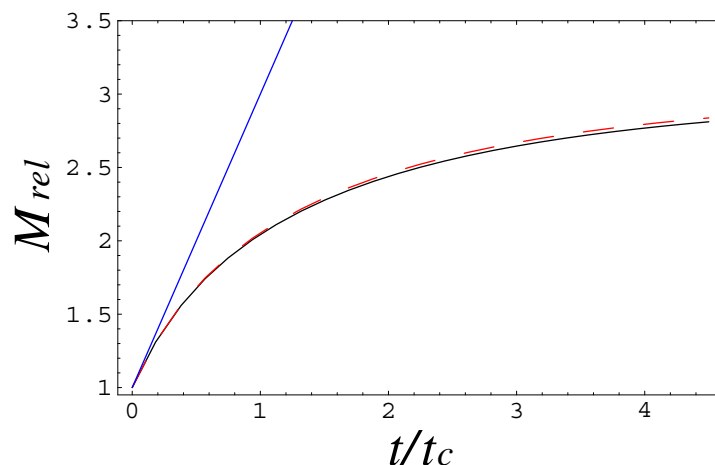


Abbildung C.3: Sequentielle Monomeraddition. Schwarz: M_{rel} für sequentielle Monomeraddition unter Annahme einer konstanten Kernfunktion. Rot gestrichelt: M_{rel} für sequentielle Monomeraddition mit Brownscher Kernfunktion mit $d_f = 2.5$ und $d_h = 2.5$. Blau: $M_{rel} = 1 + 2t/t_c$ gemäß der üblichen Koagulation mit gleichen Raten.

Ratenkonstanten beeinflusst die Ergebnisse kaum. Der schnelle Verbrauch der Monomere erklärt die frühe Sättigung des Wachstums. Effektive Zunahme des Gewichtsmittels kann bei irreversiblen Reaktionen nur durch Zulassen der Vereinigung zwischen allen Oligomergößen stattfinden. Ansonsten werden reversible Reaktionen zu Beginn der Reaktionskaskade benötigt. Diese dienen dann als Puffer für die Grundbausteine, die an die größeren Oligomere addiert werden.

C.4 Verfeinerte Koagulationstheorien

Studien zur Aggregation von Kolloiden [Lin et al., 1989, Lin et al., 1990a] und Computersimulationen [Vicsek, 1992], die im reaktionskontrollierten Regime durchgeführt wurden, ergaben eine deutliche Abweichung vom linearen Anwachsen des normierten Gewichtsmittels M_{rel} (vgl. Gl. C.13). Die Wachstumskurven zeigten stattdessen ein exponentiellen Zeitverlauf $M_{rel} \propto \exp(Ct)$. Dieses Regime der langsamen Koagulation bei sehr niedrigen Klebewahrscheinlichkeiten ($\alpha \ll 1$) wird reaktionslimitierte Clusteraggregation (RLCA) genannt. Im Gegensatz dazu wird die Koagulation im diffusionlimitierten Fall als diffusionlimitierte Clusteraggregation (DLCA) bezeichnet ($\alpha \approx 1$) [Lin et al., 1990b]. Beide Regime können innerhalb des Smoluchowski-Ratengleichungsansatzes durch das Klassifikationsschema von van Dongen und Ernst erfasst werden [van Dongen and Ernst, 1985b,

[van Dongen and Ernst, 1985a]. Physikalisch relevante Aggregationskerne werden mittels zweier Exponenten λ und μ durch die Forderungen

$$\begin{aligned} k_{a i, a j} &= a^\lambda k_{i, j} \quad \text{mit} \quad \lambda \leq 2 \\ \text{und für } i \ll j \quad k_{i, j} &\propto i^\mu j^\nu \quad \text{mit} \quad \nu \leq 1, \lambda = \mu + \nu \end{aligned} \quad (\text{C.15})$$

charakterisiert. Die Restriktionen $\lambda \leq 2$ und $\nu \leq 1$ müssen aufgestellt werden, um zu garantieren, dass die Reaktivität der Aggregate nicht schneller wächst als ihre Masse [Ernst, 1986]. Die erste Relation von Gl. C.15 setzt den Aggregationskern als homogene Funktion vom Grade λ an, wobei a eine beliebige Konstante ist. Der Homogenitätsexponent λ verknüpft die Reaktionsrate von zwei kleinen Aggregaten mit der von zwei großen Aggregaten. Er ist durch $\lambda = 1/d_f - 1/d_h$ im Falle Brownscher Kernfunktionen (vgl. Gl. C.11) gegeben. Die Aggregationsrate nimmt für positive λ mit zunehmender Aggregatgröße zu und nimmt für negative Werte ab. λ bestimmt daher den gesamten Zeitverlauf des Aggregationsmechanismus.

Der Exponent μ kontrolliert die Raten mit der kleine Oligomere an große Aggregaten binden. Er bestimmt daher die Form der Oligomerverteilung n_k . Die Forderung $\lambda = \mu + \nu$ garantiert die Homogenität vom Grade λ in der zweiten Beziehung von Gl. C.15. Positive Werte von μ favorisieren die Reaktion von großen Aggregaten untereinander, so dass kleine Oligomere zurückgelassen werden und die Oligomerverteilung n_k verbreitert wird. Die Vereinigung von kleinen mit großen Aggregaten wird bei negativen Werten bevorzugt, wie z.B. bei Brown'schen Kernfunktionen von Fraktalen ($\mu = -1/d_h$). Schärfere Aggregatverteilungen n_k werden dadurch begünstigt.

Lösungen der Smoluchowski-Koagulationsgleichung C.9 mit monodisperser Anfangsbedingung [Ziff, 1984] bzw. Skalenargumente mit der Annahme einer selbsterhaltenden Aggregatverteilung [van Dongen and Ernst, 1985b] legen ein generelles Potenzgesetz für die Zeitentwicklung des normierten Gewichtsmittel von der Art

$$M_{rel}(t) = \left(1 + \frac{2t}{t_c}\right)^z \quad (\text{C.16})$$

nahe [Olivier and Sorensen, 1990]. Der dynamische Skalierungsexponent z ist mit dem Homogenitätsexponenten λ durch $z = 1/(1 - \lambda)$ verknüpft. Das DLCA-Regime ist durch $\lambda = 0$ und $\alpha \approx 1$ gegeben. Die Lösung für M_{rel} reduziert sich dann auf die bereits bekannte für eine konstante Kernfunktion (Gl. C.13). RLCA findet für $\lambda \rightarrow 1$ und $\alpha \ll 1$ statt. In diesem Grenzfall wird die Lösung C.16 nach Einsetzen des entsprechenden Ausdrucks für z in eine Exponentialfunktion überführt. Intermediäre Werte gehören zu dem sogenannten Übergangsbereich (XOVER). Der Exponent z und damit λ sind Funktionen der Lösungsmittelbedingungen, wie etwa der Ionenstärke und dem pH. Variationen dieser Parameter können benutzt werden, um das Aggregationsregime zwischen reinem RLCA- und DLCA-Regime einzustellen [Asnaghi et al., 1992, Mallamace et al., 1999]. Die physikalische Ursache und der Beginn des Übergangsbereichs sind immer noch Gegenstand einer regen Debatte [Odriozola et al., 2001b, Kyriakidis et al., 1997]. Neueste Entwicklungen von Kernfunktionen scheinen eine konsistente Beschreibung für alle Werte von λ zu

erlauben [Di Biasio et al., 1994, Schmitt et al., 2000, Odriozola et al., 2001b]. Dabei treten teilweise Zeitverläufe für M_{rel} auf, die einen Übergang von einem anfänglich exponentiellen zu einem linearen Zeitverlauf aufweisen und die Kernfunktion gleichzeitig einen Homogenitätsexponenten mit $\lambda = 0$ besitzt [Odriozola et al., 2001a].

C.5 Zum Diffusions-Kollisions-Modell der Proteinfaltung

Im Rahmen des Diffusions-Kollisions-Modells bilden sogenannte Mikrodomänen die Grundbausteine, aus denen Proteine zusammengesetzt sind [Karplus and Weaver, 1976]. Die ein-

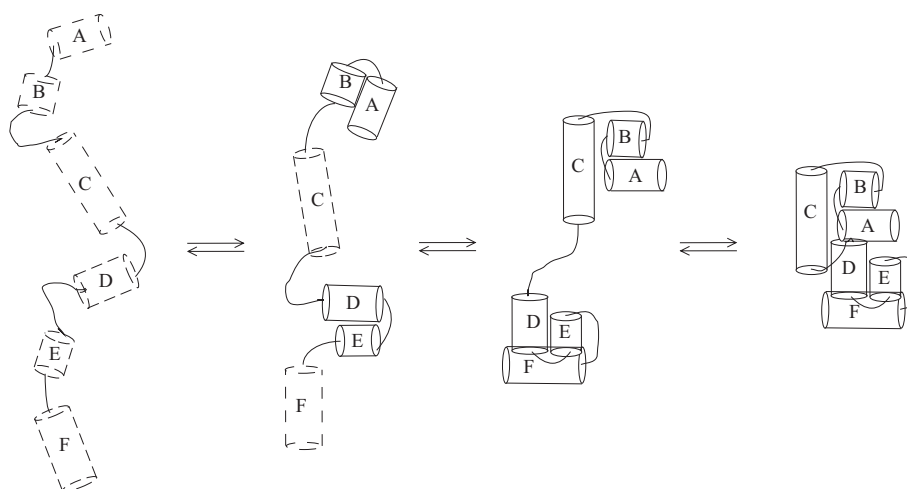


Abbildung C.4: Diffusions-Kollisions-Modell der Proteinfaltung gemäß Karplus & Weaver [Karplus and Weaver, 1994]. Die Zylinder symbolisieren die Mikrodomänen. In der entfalteten Kette links nehmen sie alle möglichen Konformationen an, was durch die gestrichelt gezeichneten Linien angedeutet ist. Eine erfolgreiche Vereinigung zweier Mikrodomänen kann im gezeigten Beispiel nur stattfinden, wenn sie bei der Kollision die Konformation, die sie im nativen Protein besitzen, annehmen. Das Verschmelzen der Mikrodomänen führt zu ihrer Stabilisierung mit der korrekt gefalteten Sekundärstruktur. Der gezeigte Faltungsweg besitzt zwei Intermediate, deren Bildung sequentielle sowie auch parallele Aspekte beinhaltet. So stabilisieren sich im ersten Schritt gleichzeitig die Domänen A-B und D-E. Hingegen verläuft z.B. die Vereinigung der Domänen A-B-C rein sequentiell während der ersten beiden Reaktionsschritte. Es sind durchaus völlig andere Reihenfolgen der Vereinigung der Mikrodomänen A-E denkbar, die aber dann einen anderen Reaktionsmechanismus darstellen würden.

zelen Mikrodomänen sind hinreichend kurze Abschnitte der Polypeptidkette, die innerhalb eines Bruchteiles der Faltungszeit τ_f des Proteins alle möglichen Konformationen annehmen können (siehe Abb. C.4). Dadurch wird ein Durchsuchen des Konformationsraums des gesamten Proteins vermieden. Die Faltung des Proteins wird damit auf einer realistischen Zeitskala ermöglicht. Mikrodomänen bewegen sich diffusiv und es finden Kollisionen zwischen ihnen statt. Sie stellen Quasiteilchen dar, die um ihre native Sekundärstruktur

fluktuieren. Sie sind somit instabile Gebilde, die nur durch eine Kollision und anschließende Verschmelzung mit einer anderen Mikrodomäne in einer bestimmten Konformation stabilisiert werden können. Innerhalb dieses Rahmens sind leicht sequentielle bzw. parallele Faltungswege eines Proteins denkbar. Auch die vorübergehende Bildung falsch gefalteter intermediärer Zustände kann plausibel erklärt werden [Karplus and Weaver, 1994].

Der Vorteil des Diffusions-Kollisions-Modell besteht neben der rein qualitativen Anwendbarkeit in der Möglichkeit, mathematische Ausdrücke ableiten zu können [Karplus and Weaver, 1979], die quantitative Abschätzungen und Vergleiche mit Experimenten erlauben [Islam et al., 2002]. Ausgangspunkt ist die Diffusionsgleichung C.3 für kugelsymmetrische Geometrien. Die Bewegung zweier Mikrodomänen innerhalb eines entfalteten Proteins wird als Diffusions zwischen zwei konzentrischen Kugeln modelliert [Karplus and Weaver, 1979]. Die Konnektivität des Proteinrückgrats geht dabei nur durch die Dicke der Kugelschale ein. Diese entspricht der Länge der voll ausgestreckten Polypeptidkette, die beide Mikrodomänen verbindet.

Das Diffusions-Kollisions-Modell beschreibt die Proteinfaltung als Koagulation von Quasiteilchen in einer eingeschränkten Geometrie. Die Anzahl der Quasiteilchen ist dabei natürlich für ein bestimmtes Protein fest vorgegeben und einheitlich. Sieht man die Quasiteilchen als kolloide Partikel an, so ist die Analogie eines Proteins mit kolloiden Aggregaten in der Perspektive des Diffusions-Kollisions-Modells nicht von der Hand zu weisen. Die unzulässige Gleichsetzung beider war ja der Ausgangspunkt des eingangs erwähnten Kolloid/Makromolekül-Disputes.

D. Faktoranalyse

In diesem Kapitel wird die Faktoranalyse, die zur Bestimmung des Informationsgehaltes und zur Auswertung der kinetischen Messungen der CD- und FTIR-Spektren herangezogen wurde, vorgestellt. Ursprünglich wurde die Faktoranalyse in den dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts von Verhaltensforschern im Zusammenhang mit der Messung von den Leistungen von Schülern entwickelt [Hotelling, 1933]. Es handelt sich somit um einen Komplex von Methoden, der zur Analyse von Daten aus den verschiedensten Wissenschaftsdisziplinen angewandt werden kann. Die Faktoranalyse hielt im Laufe der sechziger Jahre des 20. Jahrhunderts Einzug in die Chemie [Malinowski, 2002]. Wir werden uns hier auf die Anwendung der Faktoranalyse auf spektroskopische Daten innerhalb des Gültigkeitsbereichs des Beerschen Gesetzes beschränken.

Der erste Abschnitt dient zur Motivation und Einstimmung auf die Problemstellungen, die mit Hilfe der Faktoranalyse angegangen werden können. Die dazu notwendigen mathematischen Hilfsmittel werden im darauffolgenden Unterkapitel vorgestellt. Die Bestimmung der sogenannten Faktoren wird bei experimentellen Daten durch experimentelle Fehler, unter denen dem nicht zu beseitigendem Rauschen die Hauptrolle zukommt, erschwert. Die Diskussion des Einflusses der Fehlerquellen führt zur Aufstellung verschiedener Kriterien zur Bestimmung der Faktoren, die im letzten Unterkapitel eingeführt werden.

D.1 Problemstellung und Ziel der Faktoranalyse

Die Untersuchung von Komplexbildungen, Substratbindungen und Faltungsreaktionen, sowie vieler anderer chemischer Prozesse mittels spektroskopischer Methoden, wie der CD-, FTIR- oder UV/Vis-Spektroskopie, führt auf Datenmatrizen, die vom Typ Gl.D.1 sind. Die verschiedenen Zeilen i der Matrix \mathbf{A} innerhalb einer Spalte k enthalten die bei verschiedenen Wellenlängen gemessenen Absorptionswerte bei sonst identischen Bedingungen. In den Spalten k sind die Änderungen der Absorptionswerte mit der Variation äußerer Parameter kodiert. Dabei kann es sich z.B. um die selbe Lösung bei verschiedenen Temperaturen, pH-Werten oder Substratkonzentrationen bei sonst identischen Bedingungen handeln. Re-

aktionskinetiken werden üblicherweise durch Messungen des Reaktionsgemisches bei fortlaufender Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht.

$$\mathbf{A} = \begin{array}{c} \text{Wellenlänge} \\ 220 \text{ nm} \\ 215 \text{ nm} \\ 210 \text{ nm} \\ 205 \text{ nm} \\ 200 \text{ nm} \\ 195 \text{ nm} \end{array} \begin{array}{c} \text{Zeitpunkte, pH, T, Mixtur, Substrat, ...} \\ \begin{array}{ccccc} 1 & 2 & 3 & 4 & 5 \end{array} \\ \left(\begin{array}{ccccc} 0.005 & 0.031 & 0.063 & 0.091 & 0.046 \\ 0.040 & 0.176 & 0.476 & 0.444 & 0.208 \\ 0.097 & 0.287 & 0.467 & 0.501 & 0.199 \\ 0.116 & 0.232 & 0.547 & 0.621 & 0.239 \\ 0.123 & 0.234 & 0.498 & 0.444 & 0.185 \\ 0.101 & 0.265 & 0.429 & 0.374 & 0.152 \end{array} \right) \end{array} \quad (\text{D.1})$$

Die Absorption A_{ik} eines Reaktionsgemisches bei einer Wellenlänge λ_i zu einem Zeitpunkt t_k wird physikalisch durch das Beer'sche Gesetz

$$A_{ik} = l \sum_{j=1}^n \epsilon_j(\lambda_i) c_j(t_k) \quad \text{bzw. in Matrixnotation} \quad \mathbf{A} = l \mathbf{E} \mathbf{C} \quad (\text{D.2})$$

beschrieben. Darin bezeichnet ϵ_j den molaren Extinktionskoeffizienten der j chemischen Spezies, der in den Einheiten $M^{-1}\text{cm}^{-1}$ angegeben wird. Die Funktion $\epsilon_j(\lambda)$ wird das Absorptionsspektrum der j -ten Komponente genannt. Die Abmessungen der durchstrahlten Probe gehen durch die Schichtdicke l , die in cm angegeben wird, ein. Die Absorption einer Komponente ist deren Konzentration c_j im Reaktionsgemisch proportional. Die Gesamtaborption ergibt sich dann als die Summe über die einzelnen Beiträge j der n spektroskopisch unterscheidbaren chemischen Spezies. In der Matrixschreibweise beinhalten die n Spalten der Spektralmatrix \mathbf{E} die einzelnen Spektren $\epsilon_j(\lambda)$ der chemischen Bestandteile des Reaktionsgemisches. Dementsprechend enthält die Konzentrationsmatrix \mathbf{C} die n Zeitverläufe der Konzentrationen der Komponenten, die sogenannten Konzentrationsprofile, als Zeilen.

Das Ziel der Faktoranalyse ist aus der Datenmatrix (Gl. D.1) die Anzahl der absorbierenden chemischen Substanzen im Reaktionsgemisch zu bestimmen. Darüberhinaus soll das Konzentrationsprofil und das Spektrum der jeweiligen chemischen Spezies extrahiert werden. Aus mathematischer Sicht wird versucht, die Datenmatrix (Gl. D.1) in der Form des Beer'schen Gesetzes (Gl. D.2) zu faktorisieren.

D.2 Mathematische Werkzeuge

Zur Faktorisierung von beliebigen Matrizen stehen mehrere Verfahren zur Verfügung [Press et al., 1992]. Wir werden uns hier auf die zwei am häufigsten angewandten Methoden der sogenannten Singulärwertzerlegung (SVD) [Eckhart and Young, 1939] und der Hauptkomponentenanalyse (PCA) [Malinowski, 2002] beschränken, die sich bei näherer Betrachtung als weitestgehend äquivalent erweisen. Unterschiede ergeben sich bei der konkreten numerischen Umsetzung und Stabilität der Algorithmen [Press et al., 1992], was

aber ausserhalb des Rahmens dieses Anhangkapitels liegt. In dieser Arbeit wurde die SVD-Routine, die innerhalb des Programms MATHEMATICA bereitgestellt wird, verwendet [Wolfram, 2001].

Eine beliebige $m \times n$ Datenmatrix \mathbf{A} , deren Anzahl an Zeilen m größer oder gleich ihrer Anzahl an Spalten n ist, kann als Produkt einer $m \times n$ spaltenorthogonalen Matrix \mathbf{U} , einer $n \times n$ Diagonalmatrix \mathbf{S} mit Elementen, die größer oder gleich null sind, und einer transponierten, quadratischen $n \times n$ spaltenorthogonalen Matrix \mathbf{V} geschrieben werden. Die verschiedenen Größen dieser Matrizen sollen durch die Gleichung D.3 verdeutlicht werden

$$\begin{pmatrix} \mathbf{A} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \mathbf{U} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} s_1 & & \\ & \dots & \\ & & s_n \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mathbf{V}^T \end{pmatrix} = \mathbf{USV}^T \quad . \quad (\text{D.3})$$

Die Orthogonalitätseigenschaften der Matrizen \mathbf{U} und \mathbf{V} sind in Gleichung D.4 in mathematischer Form aufgeführt

$$\mathbf{U}^T \cdot \mathbf{U} = \mathbf{V}^T \cdot \mathbf{V} = \mathbf{1}_n \quad . \quad (\text{D.4})$$

Dabei ist zu beachten, dass \mathbf{V} auch zeilenorthogonal ist, d.h. $\mathbf{V}\mathbf{V}^T = \mathbf{1}_n$, da sie eine quadratische Matrix ist. Die SVD sortiert die Diagonalelemente der Matrix \mathbf{S} , die sogenannten Singulärwerte, ihrer Grösse nach

$$s_1 \geq s_2 \geq \dots \geq s_n \geq 0 \quad (\text{D.5})$$

in absteigender Reihenfolge (Gl. D.5). Falls die Datenmatrix \mathbf{A} eine Dimensionalität bzw. Rang p kleiner n besitzt ($p < n$), so gilt für die Singulärwerte $s_{p+1} = \dots = s_n = 0$.

Eine andere Vorgehensweise besteht darin, die Datenmatrix \mathbf{A} zu transponieren und mit sich selbst zu multiplizieren, was die zur Matrix \mathbf{A} zugehörige Kovarianzmatrix \mathbf{Cov} , die eine symmetrische $n \times n$ Matrix ist, ergibt

$$\mathbf{Cov} = \mathbf{A}^T \mathbf{A} = \mathbf{T} \begin{pmatrix} \lambda_1 & & \\ & \dots & \\ & & \lambda_n \end{pmatrix} \mathbf{T}^T \quad . \quad (\text{D.6})$$

Nach einem aus der linearen Algebra bekannten Satz lässt sich jede symmetrische Matrix, wie in Gleichung D.6 dargestellt, diagonalisieren [I.N.Bronstein and K.A.Semendjajew, 1989]. Die Methode wird Hauptkomponentenanalyse genannt [Malinowski, 2002].

Der Zusammenhang zur SVD kann einfach durch Einsetzen des Ausdrucks der SVD für die Matrix \mathbf{A} in die Kovarianzmatrix \mathbf{Cov} hergestellt werden (vgl. Gl. D.7)

$$\mathbf{Cov} = \mathbf{A}^T \mathbf{A} = (\mathbf{USV}^T)^T \mathbf{USV}^T = \mathbf{VSU}^T \mathbf{USV}^T = \mathbf{VS}^2 \mathbf{V}^T. \quad (\text{D.7})$$

Vergleich der Ausdrücke D.3, D.6 und D.7 ermöglicht die in Gleichung D.8 vorgenommenen Identifikationen

$$\begin{aligned} s_i &= \lambda_i^{1/2} \\ \mathbf{V} &= \mathbf{T} \end{aligned} \quad (\text{D.8})$$

Die Singulärwerte sind gleich den Wurzeln der Eigenwerte der Kovarianzmatrix \mathbf{Cov} . Die Transformationsmatrix \mathbf{T} , deren Spalten die Eigenvektoren der Kovarianzmatrix sind, entspricht der Matrix \mathbf{V} .

D.3 Beispiel mit simulierten Daten

Wir wollen die in den letzten beiden Abschnitten vorgestellten Konzepte und Verfahren an dem Beispiel einer irreversiblen, konsekutiven, bimolekularen Reaktion veranschaulichen (Gl. D.9).



Die kinetischen Gleichungen dieser Reaktion wurden von Chien 1948 analytisch gelöst [Chien, 1948]. Die Zeitverläufe der Zahlkonzentrationen sind für ein Verhältnis von $\frac{k_2}{k_1} = \frac{1}{2}$ der Ratenkonstanten auf einer willkürlich gewählten Zeitskala in Abbildung D.1(d) aufgetragen.

Die in Gleichung D.1 auftretenden chemischen Spezies wurden durch FTIR-Spektren modelliert, die im Sinne der Euklid'schen Norm auf Eins normiert wurden. Das für das Edukt N_α verwendete FTIR-Spektrum ist das FTIR-Spektrum des Myoglobins, das ein zu 80% α -helikales Protein ist (Abb. D.1 (a)). Für das Intermediat $I_{\alpha/\beta}$ wurde das Spektrum der Mutante V55C des λ -Cro-Repressors ausgewählt (Abb. D.1 (b)). Cro-V55C ist ein zu 36% α -helikales und zu 27% β -faltblatthaltiges Protein. Das FTIR-Spektrum des Produktes P_β entspricht dem Spektrum des β_2 -Mikroglobulins, das nur β -Faltblattstrukturen (47%) an geordneter Sekundärstruktur (Abb. D.1 (c)) enthält. Durch Anwendung des Beer-schen Gesetzes (Gl. D.2) wurde die in Abb. D.1 (e) dargestellte FTIR-Kinetik generiert. Abzug des Anfangsspektrums, das dem Eduktspektrum entspricht, liefert den daneben dargestellten Satz an Differenzspektren (D.1 (f)), aus dem die spektralen Veränderungen während des Ablaufes der simulierten Reaktion leichter ersichtlich sind. Das Beispiel wurde so gewählt, um den Aspekten der β -Strukturbildung und Aggregation bei der Fehlfaltung von Proteinen möglichst nahezukommen.

Faktor	Absorptionsspektren	Differenzspektren
1	10.9313	1.72765
2	0.296343	0.081553
3	0.048671	-

Tabelle D.1: Singulärwerte der Faktoren des simulierten Beispiels

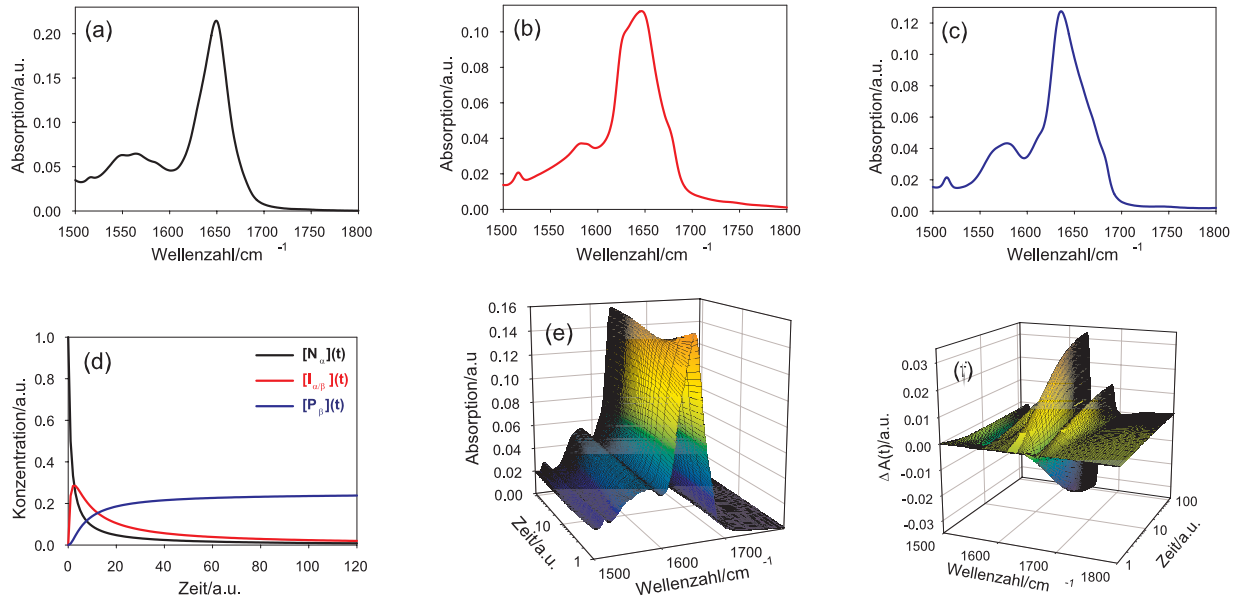


Abbildung D.1: Simulierte Daten, denen die Kinetik einer irreversiblen, konsekutiven, bibimolekularen Reaktion zugrundeliegen: (a) Spektrum von N_α , (b) Spektrum von $I_{\alpha/\beta}$ (c) Spektrum von P_β , (d) Konzentrationsverläufe, (e) Absorptionsspektren, (f) Differenzspektren. Es handelt sich um eine 313×120 Matrix, wobei ein Spektrum aus 313 Spektralwerten und ein Zeitverlauf aus 120 Konzentrationswerten besteht.

Die den Absorptionsspektren zugrundeliegende Datenmatrix umfaßt 313×120 Datenpunkte. SVD der Absorptionsspektren liefert die in Tabelle D.1 aufgeführten Singulärwerte. Nur drei Singulärwerte sind von Null verschieden, was der Anzahl der Faktoren entspricht und aufgrund der Konstruktion des Beispiels mit einem intermediären Zustand zu erwarten war. Die Singulärwerte der Faktoren sind nach ihrer Größe geordnet. Die zugehörigen Spektren und Konzentrationsprofile sind in Abb. D.2 dargestellt. Der Vergleich mit den ursprünglichen Spektren und Profilen (Abb. D.1) weist auf ein wesentliches Problem bei der Faktoranalyse hin.

Die Faktorisierung durch ein rein mathematisches Verfahren wie der SVD führt auf eine Zerlegung in zunächst rein abstrakte Spektren und Profile, die in nur sehr beschränktem Maße, wenn überhaupt, physikochemisch sinnvoll interpretiert werden können

$$\begin{aligned}
 \mathbf{A} &= \mathbf{U}\mathbf{S}\mathbf{V}^T = \mathbf{U}(\mathbf{S}\mathbf{V}^T) = \mathbf{E}_{\text{abstract}}\mathbf{C}_{\text{abstract}} \\
 &= \mathbf{E}_{\text{abstract}} \underbrace{(\mathbf{T}^{-1}\mathbf{T})}_{=\mathbf{1}_n} \mathbf{C}_{\text{abstract}} \\
 &= (\mathbf{E}_{\text{abstract}}\mathbf{T}^{-1})(\mathbf{T}\mathbf{C}_{\text{abstract}}) = \mathbf{E}_{\text{real}}\mathbf{C}_{\text{real}}. \quad (\text{D.10})
 \end{aligned}$$

Zwar liefert die SVD eine eindeutige Zerlegung, der Einschub einer Einheitsmatrix $\mathbf{1}_n$ als Produkt einer beliebigen Transformationsmatrix \mathbf{T} mit ihrer Inversen \mathbf{T}^{-1} in Gleichung

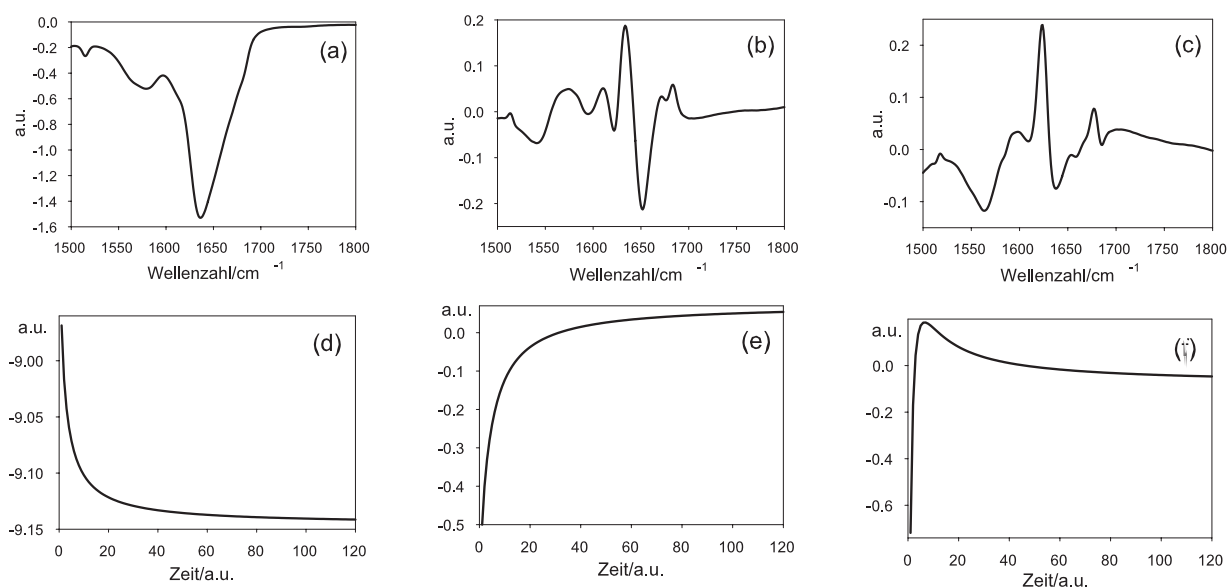


Abbildung D.2: Abstrakte Spektren und abstrakte Konzentrationsverläufe, die sich nach SVD der Absorptionsspektren (vgl. D.1 (e)) ergeben: (a) Spektrum des ersten Faktors, (b) Spektrum des zweiten Faktors, (c) Spektrum des dritten Faktors, (d) Konzentrationsprofil des ersten Faktors, (e) Konzentrationsprofil des zweiten Faktors, (f) Konzentrationsprofil des dritten Faktors.

chung D.10 zeigt aber, dass unendlich viele Faktorisierungen mit den selben Singulärwerten möglich sind. Die Spektren und Profile der abstrakten Spektralmatrix $\mathbf{E}_{\text{abstract}}$ bzw. der abstrakten Profilmatrix $\mathbf{C}_{\text{abstract}}$ sind Linearkombinationen der tatsächlichen Spektren bzw. Konzentrationsverläufe der chemischen Bestandteile des Reaktionsgemisches. Die Aufgabe besteht in der Konstruktion der Transformationmatrix T , welche die abstrakten Faktoren in die wirklichen Faktoren überführt, die physikochemisch sinnvoll interpretiert werden können.

In Tabelle D.1 sind zusätzlich die Ergebnisse der SVD-Analyse der Differenzspektren aufgeführt. Im Unterschied zum Ergebnis der Analyse der absoluten Spektren werden nur zwei Faktoren durch von Null verschiedene Singulärwerte ausgewiesen. Dies erklärt sich durch die Gültigkeit der Massenerhaltung bei der Untersuchung von Reaktionen in geschlossenen Systemen.

$$[N_{\alpha}](t) + 2[I_{\alpha/\beta}](t) + 4[P_{\beta}](t) = [N_{\alpha}](0) \quad (\text{D.11})$$

Gleichung D.11 bringt die Massenerhaltung formal zum Ausdruck und zeigt, dass einer der Zeitverläufe als Linearkombination der anderen Verläufe ausgedrückt werden kann. Verallgemeinernd kann hieraus direkt gefolgert werden, dass bei kinetischen Daten die Untersuchung der Differenzspektren die Anzahl der Faktoren um einen Faktor herabsetzt.

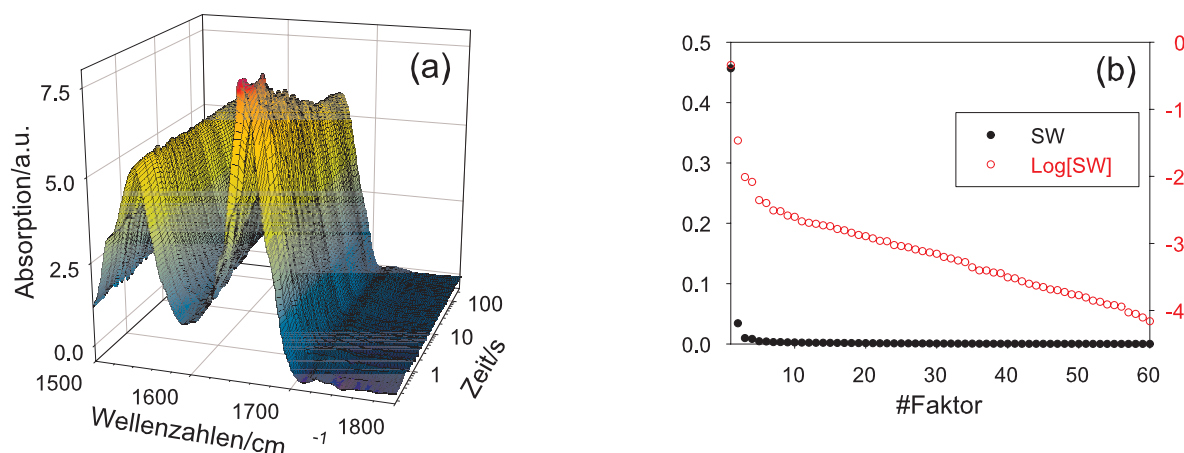


Abbildung D.3: Experimentelles Beispiel: Fehlfaltungsreaktion des SHaPrP(90-232) vgl. Kapitel (3). (a) FTIR-Spektren, (b) dazugehörige Singulärwerte (SW). Der analysierte Datensatz besteht aus 1038×60 Werten.

D.4 Auswertung experimenteller Daten

Bevor die Problematik der Bestimmung einer geeigneten Transformationsmatrix zum Tragen kommt, besteht bei experimentellen Daten das Problem, die Anzahl der Faktoren verlässlich zu bestimmen.

In Abbildung D.3 sind die FTIR-Absorptionsspektren der im Kapitel 3 besprochenen Fehlfaltungsreaktion des SHaPrP(90-232) mit den dazugehörigen Singulärwerten dargestellt. Keiner der 60 möglichen Singulärwerte verschwindet, wie der logarithmischen Auftragung in Abb. D.3 (b) zu entnehmen ist. Die Anwesenheit verschiedener Fehlerquellen, Störeinflüsse und besonders des experimentellen Rauschens führt dazu, daß normalerweise alle Singulärwerte (vgl. Gl. D.5) größer Null sind [Henry and Hofrichter, 1992]. Die Bedeutung des Singulärwerts und des damit verbundenen Faktors hängt von seiner Größe im Vergleich zu den anderen Singulärwerten ab. In Abb. D.3 (b) stechen bei der linearen Auftragung die ersten beiden Singulärwerte hervor. Die logarithmische Auftragung fördert noch den dritten und vierten Singulärwert als jeweils mögliche Kandidaten für Faktoren, die wesentliche Signalbeiträge beinhalten könnten, hervor. Der Entwicklung präziserer Methoden zur Diskriminierung von Signalanteilen und Rauschen ist die folgende Diskussion gewidmet.

D.4.1 Kriterien zur Bestimmung der Anzahl an Faktoren

E.R. Malinowski untersuchte als erster gezielt, wie Fehler bzw. Rauschen die Faktoren beeinflussen [Malinowski, 1977b]. Unter der Annahme, dass sich die Daten additiv aus reinem Signal und Rauschen zusammensetzen, konnte er zeigen, dass sich die Faktoren in zwei Gruppen aufspalten lassen. Die Gruppe der ersten i Singulärwerte repräsentiert

die Faktoren, die notwendig zur Rekonstruktion des Anteils des Datensatzes sind, der die Signale beinhaltet (vgl. Gl. D.12)

$$\{\mathbf{s}_1, \mathbf{s}_2, \dots, \mathbf{s}_i, s_{i+1}, \dots, s_{n-1}, s_n\} \quad . \quad (\text{D.12})$$

Sie werden primäre Faktoren bzw. Singulärwerte genannt. Allerdings enthalten die primären Faktoren noch eine Beimischung an Rauschen, das nicht weiter reduziert werden kann. Die weiteren $n - i$ Faktoren bestehen aus reinem Fehler bzw. Rauschen. Aus ihnen kann keine Information über die eigentlichen Signale mehr gewonnen werden. Daher werden sie als sekundäre Faktoren und Singulärwerte bezeichnet. Der entscheidende Fortschritt von Malinowski bestand nun darin, Fehlerfunktionen in Abhängigkeit der ersten i verwendeten Singulärwerte anzugeben, die eine Bestimmung bzw. eine Abschätzung der wirklichen Anzahl i der primären Faktoren auch ohne Kenntnis des tatsächlichen experimentellen Fehlers erlauben [Malinowski, 1977b, Malinowski, 1977a]. Diese Funktionen und deren Beziehungen untereinander werden im nächsten Unterabschnitt vorgestellt.

Theorie des Fehlers in der Faktoranalyse

Die Residuenstandardabweichung oder auch wirklicher Fehler (RE) genannt stellt bei Kenntnis des experimentellen Fehlers ein gutes Kriterium zur Bestimmung der Anzahl der primären Faktoren dar. Er kann als Funktion der sekundären Singulärwerte in der Form

$$RE(i) = \left(\frac{1}{m(n-i)} \sum_{j=i+1}^n s_j^2 \right)^{1/2} \quad (\text{D.13})$$

angegeben werden [Malinowski, 1977a]. Zuerst nimmt man an, dass nur der größte Singulärwert zur Gruppe der primären Faktoren gehört. Der wirkliche Fehler (RE) wird über die verbleibenden Singulärwerte berechnet. Falls der berechnete Wert von RE näherungsweise mit dem experimentellen Fehler übereinstimmt, kann daraus geschlossen werden, dass nur dieser Faktor zur Beschreibung des ganzen Datensatzes notwendig ist. Falls dies nicht der Fall ist, muss die Prozedur durch Hinzunahme weiterer Singulärwerte solange wiederholt werden, bis eine ungefähre Übereinstimmung von RE und dem experimentellen Fehler erzielt wird.

Die Eliminierung der sekundären Faktoren aus dem gemessenen Datensatz führt zur Reduzierung von Rauschen und Fehlern. Dieser beseitigte Fehler kann durch die Wurzel des mittleren quadratischen Fehlers, bzw. auch extrahierte Fehlerfunktion (XE) genannt, quantifiziert werden. Der Zusammenhang von XE mit den verwendeten Faktoren bzw. Singulärwerten ist durch den Ausdruck

$$XE(i) = \left(\frac{1}{mn} \sum_{j=i+1}^n s_j^2 \right)^{1/2} \quad (\text{D.14})$$

gegeben [Malinowski, 1977a]. Die Bestimmung der Anzahl der primären Faktoren erfolgt analog dem Vorgehen bei RE und setzt die Kenntnis über den experimentellen Fehler voraus.

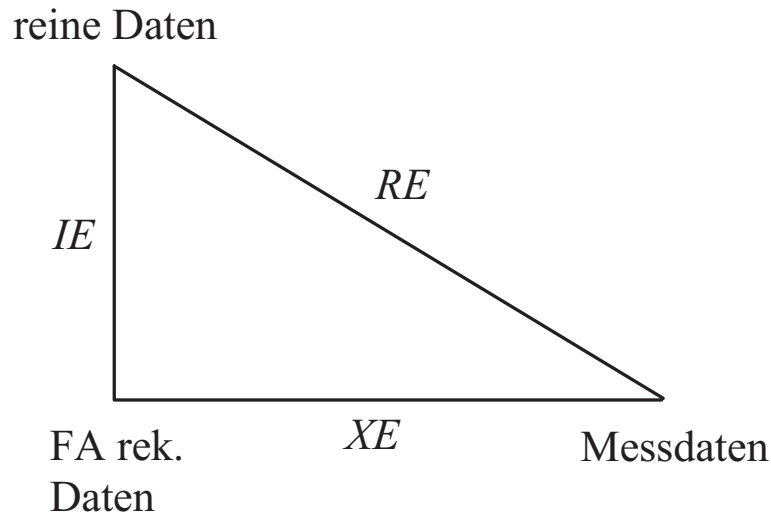


Abbildung D.4: Mnemonisches Diagramm der pythagoräischen Beziehung zwischen dem Messfehler (RE), dem extrahierten Fehler (XE) und dem eingebetteten Fehler (IE) und ihren Beziehungen zu den reinen Daten, den Messdaten und den faktoranalytisch rekonstruierten Daten.

Im Gegensatz dazu benötigt man bei Benutzung des eingebetteten Fehlers (IE) keine Information über die experimentellen Fehler. Der formale Beziehung mit den Singulärwerten ist durch die Formel

$$IE(i) = \left(\frac{i}{mn(n-i)} \sum_{j=i+1}^n s_j^2 \right)^{1/2} \quad (\text{D.15})$$

gegeben [Malinowski, 1977a]. Für die Fehler RE , XE und IE besteht eine pythagoräische Relation $XE^2 + IE^2 = RE^2$, was durch das Diagramm D.4 veranschaulicht wird und sich leicht anhand der Formeln D.13, D.14 und D.15 verifizieren lässt. Die gemessenen Daten, die sogenannten Rohdaten, ergeben sich aus hypothetisch reinen, d.h. fehlerfreien, Daten durch Hinzufügen der wirklichen Fehler (RE). Die Bestimmung der Anzahl an primären Faktoren ermöglicht die näherungsweise Rekonstruktion der reinen Daten. Diese rekonstruierten Daten sind damit von den Störeinflüssen der sekundären Faktoren bereinigt. Die erste Schlussfolgerung, die aus dem Diagramm D.4 gezogen werden kann ist, dass $IE < RE$ gilt, und damit eine faktoranalytische Rekonstruktion immer zu einer Rauschreduzierung und folglich einer Verbesserung der Daten führt.

Die Möglichkeit mit Hilfe von IE auch ohne Kenntnis des absoluten Wertes von RE die primären Faktoren bestimmen zu können, beruht auf der Tatsache, dass nach Ausschöpfung der Gruppe der primären Faktoren die Hinzunahme weiterer Faktoren, die dann aus der Menge der sekundären Faktoren stammen, zu einer Vergrößerung des eingebetteten Fehlers IE führt. Eine Auftragung von IE über i sollte folglich ein lokales Minimum bei einem i mit $i < n$ aufweisen.

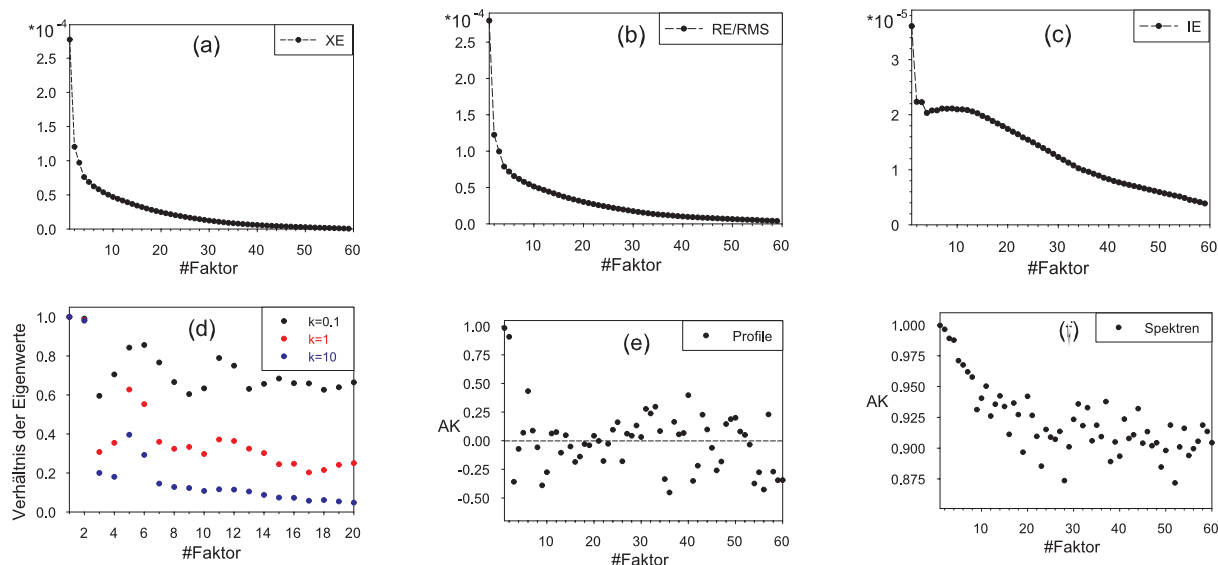


Abbildung D.5: Kriterien zur Bestimmung der Anzahl an Faktoren: (a) extrahierter Fehler (XE), (b) wirklicher Fehler (RE), (c) eingebetteter Fehler (IE), (d) RESO, (e) $C(V_i)$, (f) $C(U_i)$.

Die Fehlerfunktionen $RE(i)$, $XE(i)$ und $IE(i)$ sind in Abbildung D.5 (a)-(c) für die FTIR-Spektren der Fehlfaltungsreaktion des SHaPrP(90-232) aus Abb. D.3 dargestellt. RE und XE sind in Abhängigkeit der verwendeten Faktoren i monoton fallende Funktionen. Zur Bestimmung der korrekten Anzahl i muss ein Schwellenwert vorgegeben werden, der nicht unterschritten werden darf. Der eingebettete Fehler IE hingegen weist ein Minimum bei dem vierten Faktor auf, d.h. die Gruppe der primären Faktoren würde aufgrund dieses Kriteriums die ersten vier Faktoren umschliessen. Es muss aber berücksichtigt werden, dass systematische Fehler und ungleichförmige Fehlerverteilung wirkliche Faktoren vortäuschen und somit die tatsächliche Anzahl an primären Faktoren erhöhen können [Malinowski, 1977a]. IE kann aber auf jeden Fall als obere Schranke für die Anzahl der relevanten Faktoren benutzt werden.

Die bisher vorgestellten Kriterien zur Faktorbestimmung verwendeten nur die Singularwerte. Im nächsten Abschnitt werden Kriterien eingeführt, die Informationen, die aus den abstrakten Spektren bzw. Profilen gewonnen werden, benützen, um die Relevanz des jeweiligen Faktors zu bestimmen.

Autokorrelationskoeffizient erster Ordnung

Das Spektrum bzw. Profil eines primären Faktors sollte hauptsächlich aus Signalanteilen bestehen und damit über ein hohes Signal-zu-Rauschverhältnis verfügen. Die Kurvenverläufe primärer Faktoren sind demnach relativ glatt, während sekundäre Faktoren durch stark fluktuierende Spektren bzw. Profile charakterisiert sind. Ein Maß zur Quantifizierung der Glattheit und damit Korreliertheit eines Signalverlaufes stellen die Autokorrelations-

koeffizienten erster Ordnung \mathbf{C} für die abstrakten Spektren U_i bzw. die abstrakten Profile V_i der Faktoren i dar [Shrager and Hendler, 1982]

$$\mathbf{C}(U_i) = \sum_{j=1}^{m-1} U_{j,i} U_{j+1,i} \quad \text{bzw.} \quad \mathbf{C}(V_i) = \sum_{j=1}^{n-1} V_{j,i} V_{j+1,i} \quad . \quad (\text{D.16})$$

Da die Spektren bzw. Profile normiert sind, nehmen die jeweiligen Autokorrelationskoeffizienten Werte zwischen $-1 < \mathbf{C} < 1$ an. Dabei stehen Korrelationskoeffizienten nahe eins für hochkorrelierte Signalverläufe. Als Schwellenwert für einen relevanten Faktor wird häufig der Wert $\mathbf{C} = 0.5$ benutzt, der etwa einem Signal-zu-Rauschverhältnis von 1 : 1 entspricht [Henry and Hofrichter, 1992]. Faktoren, deren Spektren bzw. Profile Autokorrelationskoeffizienten unterhalb dieses Wertes besitzen, werden der Gruppe der sekundären Faktoren zugeordnet und nicht weiter berücksichtigt.

In Abb. D.5 (e) ist der Autokorrelationskoeffizient $\mathbf{C}(U_i)$ des jeweiligen Faktors i dargestellt. Nur die ersten beiden Faktoren besitzen Profile, deren Koeffizient nahe der Eins ist. Die Kurvenverläufe der ersten drei Profile sind in Abbildung D.6 (d)-(f) dargestellt. Aus den ersten beiden Profilverläufen sind deutliche Signalverläufe entnehmbar, während das Profil des dritten Faktors leicht unterhalb der Nulllinie fluktuiert und mit einem Korrelationskoeffizienten von $\mathbf{C}(U_3) = -0.36$ fast nur noch Rauschen verkörpert. Die Anzahl der primären Faktoren würde demnach auf zwei geschätzt werden.

Die Autokorrelationskoeffizienten der Spektren $\mathbf{C}(V_i)$ in Abb. D.5 (f) weisen auf eine Besonderheit der FTIR-Spektroskopie hin. Die niedrigsten Autokorrelationskoeffizienten besitzen Werte um $\mathbf{C}(V_{52}) = 0.872$. Alle Spektren weisen somit sehr hohe Koeffizienten nahe bei der Eins auf. Bei der FTIR-Spektroskopie wird ein Interferogramm gemessen, in dem alle Information über das Spektrum als fouriertransformierter Zeitverlauf des Signal kodiert ist. Die Signalverläufe und das Rauschen sind somit innerhalb eines Interferogramms, das einem kompletten Spektrum entspricht, hoch korreliert. Die ersten drei abstrakten FTIR-Spektren nach SVD sind in Abb. D.6 (a)-(c) gezeigt. Auch das dritte Spektrum scheint klare Signalanteile zu besitzen. Die Verwendung des Autokorrelationskoeffizienten erster Ordnung erlaubt im Falle der abstrakten FTIR-Spektren keine Schlüsse über die Anzahl der primären Faktoren.

RESO

Neueste Studien führten auf ein Kriterium, dass sowohl die Informationen von den Singulärwerten mit den Informationen von den abstrakten Profilverläufen kombiniert [Chen et al., 1999]. Zuerst werden die Singulärwerte der Rohdaten bestimmt. Dann werden die Rohdaten geglättet und die Singulärwerte der geglätteten Daten berechnet. Die Quadrate der nach Glättung erhaltenen Singulärwerte werden durch die Quadrate der ursprünglichen Singulärwerte geteilt. Diese Verhältnisse werden für verschieden stark geglättete Rohdaten berechnet. Die Stärke der Glättungsprozedur wird durch die Größe des Parameters k beschrieben, der den Glättungsoperator bei dem verwendeten Algorithmus ankoppelt [Chen et al., 1999]. Die Anzahl der primären Faktoren läßt sich bei der Nummer des Faktors ablesen, nach dem ein abrupter Abfall dieses Verhältnisses unabhängig von der Größe

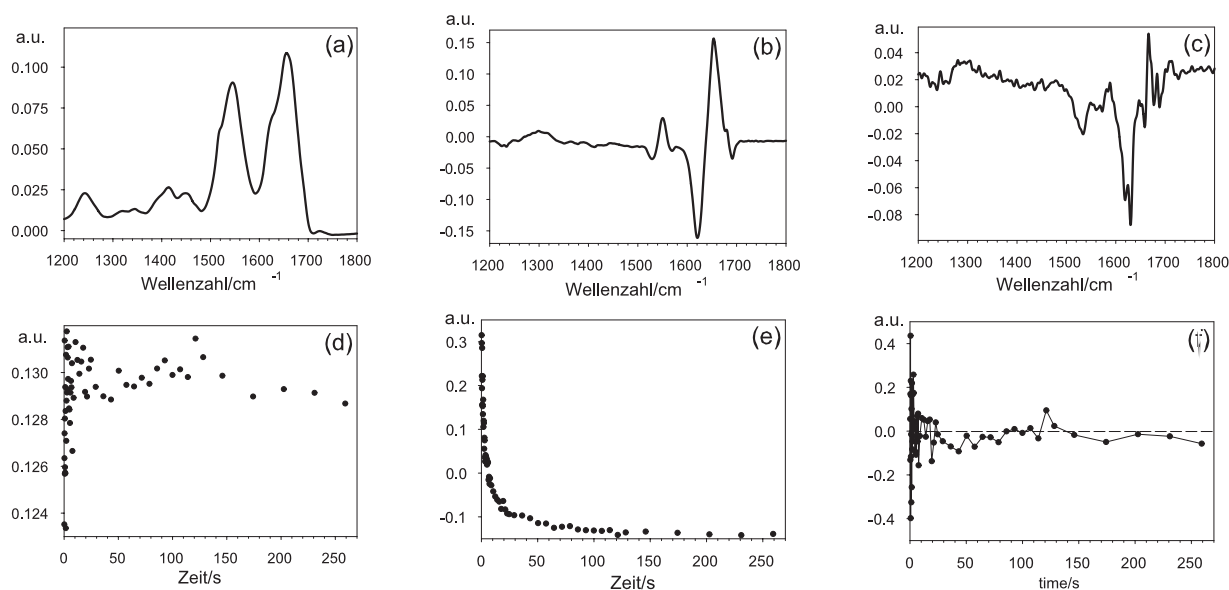


Abbildung D.6: Ergebnis der SVD-Analyse der FTIR-Spektren des SHaPrP(90-232): abstrakte Spektren und abstrakte Profile. (a) Spektrum des ersten Faktors, (b) Spektrum des zweiten Faktors, (c) Spektrum des dritten Faktors, (d) Profil des ersten Faktors, (e) Profil des zweiten Faktors, (f) Profil des dritten Faktors.

von k stattfindet. Die zugrundeliegende Idee besteht darin, dass ein sekundärer Faktor, der nur aus dem Rauschanteil der Daten besteht, stark durch das Glätten der Daten beeinflusst wird, weswegen das Verhältnis der Quadrate der geglätteten zu den ungeglätteten Singulärwerten schon für kleine Werte des Kopplungsparameters k deutlich abfallen sollte. Das Akronym RESO leitet sich von "Ratio of Eigenvalues calculated by Smoothed and Ordinary PCA" aus dem Englischen ab. Die Eigenwerte der Hauptkomponentenanalyse (PCA) entsprechen ja den Quadraten der Singulärwerte der SVD-Zerlegung (vgl. Gl. D.8).

In Abbildung D.5 (d) ist der Index RESO für die Fehlfaltungsreaktion des SHaPrP(90-232) berechnet. Der Wert von RESO für den dritten Faktor fällt schon für den kleinsten Wert $k = 0.1$ deutlich ab, so dass aufgrund dieses Indexes die Gruppe der primären Faktoren mit den ersten beiden Faktoren identifiziert würde. Bei jeglicher Art von Glättungsprozedur besteht die Gefahr, dass selbst bei schwacher Glättung schon wesentliche Details aus den Daten ausgebügelt werden, was zu einer zu niedrigen Schätzung der primären Faktoren führen kann. Das Ergebnis einer Analyse mit RESO kann jedoch immer als untere Grenze für die wirkliche Anzahl an relevanten Faktoren herangezogen werden.

Die hier vorgestellten Indizes zur Bestimmung der Anzahl an primären Faktoren stellen eine teilweise subjektive Auswahl dar, die sich bei der Arbeit des Autors als besonders nützlich erwiesen haben. Weitere Indizes und kritische Vergleiche zwischen ihnen sind bei Meloun et al. zu finden [Meloun et al., 2000].

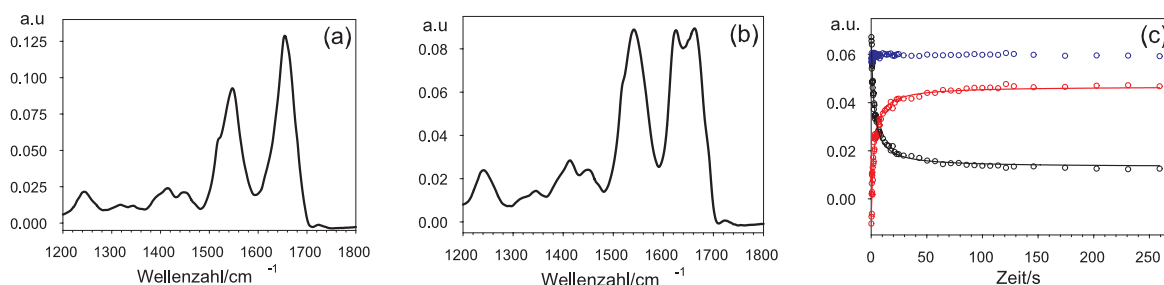


Abbildung D.7: Transformierte Spektren und Profile: (a) Eduktspektrum, (b) Produktspektrum, (c) Konzentrationsprofile: Edukt (schwarz), Produkt (rot), Summe (blau)

D.4.2 Transformation des Beispiels

Die bisher betrachteten Indizes weisen auf zwei (RESO, $\mathbf{C}(V_i)$) bzw. vier (IE) primäre Faktoren hin, die für die Änderungen der FTIR-Spektren bei der Fehlfaltungsreaktion des SHaPrP(90-232) in Abb. D.3 verantwortlich sind. Bei der Untersuchung der FTIR-Differenzspektren, bei denen die Differenzen mit dem Endspektrum gebildet wurden, weisen alle Indizes nur noch einen relevanten Faktor aus (vgl. Kapitel Prion), weswegen im Fall der FTIR-Absolutspektren auch nur die ersten beiden Faktoren als primäre Faktoren angesehen werden (vgl. Kapitel A.3). Es handelt sich also um eine Reaktion zwischen zwei Zuständen, dem Edukt und Produkt, ohne dass noch ein weiterer Zustand durchlaufen wird. In diesem Fall lässt sich das abstrakte Spektrum des ersten Faktors näherungsweise mit dem normierten Summenspektrum aus Edukt- und Produktspektrum identifizieren (vgl. Abb. D.6 (a)). Das Spektrum des zweiten Faktors entspricht etwa dem normierten Differenzspektrum zwischen Produkt- und Eduktspektrum (vgl. Abb. D.6 (b)) [Dioumaev, 1997]. Bei kinetischen Messungen entspricht in etwa dem Eduktspektrum meist das erste Spektrum, das schnell nach Initiierung der Reaktion gemessen wird. Am Ende der Beobachtungszeit kann meist in sehr guter Näherung das letzte Spektrum als Spektrum des Produktes angesehen werden. Mit diesen Annahmen lässt sich die Transformationsmatrix \mathbf{T} , die den Übergang von den abstrakten zu den wirklichen Faktoren ermöglicht, explizit konstruieren. Das Ergebnis für die Fehlfaltungsreaktion von SHaPrP(90-232) ist in Gleichung D.17 zu sehen.

$$\mathbf{T} = \begin{pmatrix} 0.990341 & 0.990341 \\ 0.138651 & -0.138651 \end{pmatrix} \quad (\text{D.17})$$

Mit dieser Matrix \mathbf{T} lassen sich die relevanten abstrakten Faktoren von Abb. D.6 zu den wirklichen Faktoren, die in Abb. D.7 gezeigt sind, transformieren.

Die Anpassung an die Zeitverläufe der Edukt- bzw. Produktkonzentration entspricht der Kinetik einer Reaktion zweiter Ordnung. Zur Kontrolle ist der Zeitverlauf der Summe der Edukt- und Produktkonzentration gezeigt, die sich wie erwartet als konstant erweist.

Die Differenzspektren, die sich als Differenz der Absorptionsspektren von Abb. D.3 mit dem ersten Spektrum ergeben, sind in Abb. D.8 (a) dargestellt. Die Absorptionsspektren wurden durch die in Abb. D.7 dargestellten Faktoren rekonstruiert und davon das erste Spektrum abgezogen. Die so faktoranalytisch rekonstruierten Differenzspektren sind

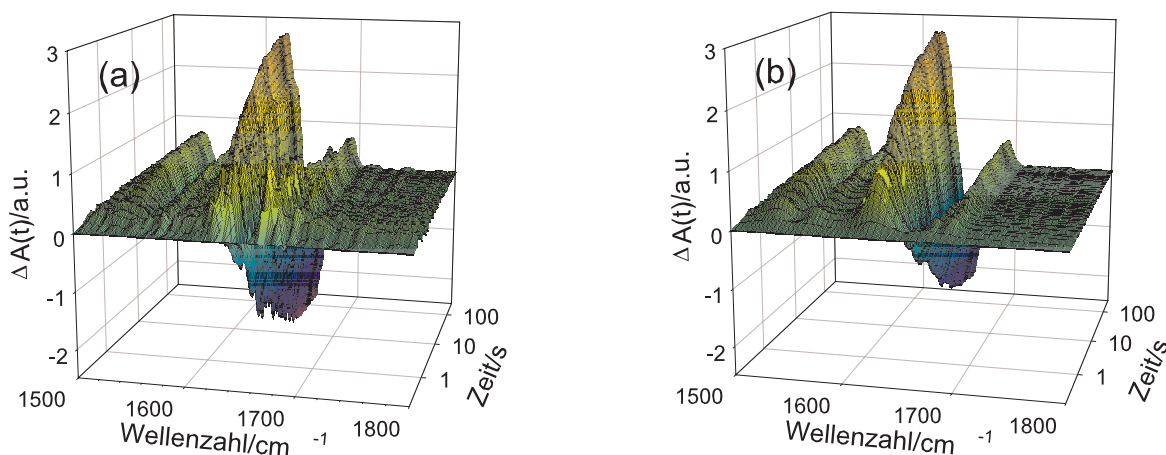


Abbildung D.8: Zur Datenverbesserung und Rauschreduzierung der durch Faktoranalyse rekonstruierten Daten. (a) Differenzspektren, die nach Abzug des Anfangsspektrums von den in Abb. D.3 (a) dargestellten FTIR-Spektren entstehen, (b) mit den ersten beiden Faktoren rekonstruierter Datensatz.

in Abb. D.8 (b) den Originaldaten gegenübergestellt. Die deutliche Rauschreduzierung und Qualitätsverbesserung der Daten ist aus dem Wellenzahlenbereich $1700\text{ cm}^{-1} < k < 1800\text{ cm}^{-1}$ besonders gut ersichtlich.

D.4.3 Probleme bei der Bestimmung der Faktoren

Zwei wesentliche Probleme bei der Bestimmung der Anzahl bzw. der Faktoren selbst werden deutlich, wenn man sich nochmals das Beer'sche Gesetz D.2 vergegenwärtigt. Ein chemischer Bestandteil eines Reaktionsgemisches geht als Produkt aus seinem Spektrum mit seiner Konzentration in die Datenmatrix ein. Falls sein Spektrum sehr ähnlich zu einer beliebigen Linearkombination der Spektren der anderen chemischen Bestandteile ist, lässt sich dieser Bestandteil praktisch nicht als eigenständiger Faktor identifizieren. Das Problem wird Kollinearität genannt [Meloun et al., 2000].

Bei sehr geringen Konzentrationen eines Stoffes ist aus dem Beerschen Gesetz direkt einsichtig, dass dieser Bestandteil nur wenig zu den gemessenen Daten beiträgt. Ein Schwellenwert von 0.5% – 1% Prozent an relativer Zahlkonzentration wird gegenwärtig in der Literatur diskutiert, unterhalb derer ein Faktor nicht mehr verlässlich identifiziert werden kann [Meloun et al., 2000]. Die Faktoren schwach besetzter Intermediate im Falle von Reaktionskinetiken sind also besonders schwierig nachweisbar.

E. Komplexe Reaktionen

Die meisten vorkommenden chemischen Prozesse sind keine elementaren Reaktionen, die in einem Schritt ablaufen und durch ein einfaches Zweizustandsmodell beschreibbar sind. Sie durchlaufen mehrere elementare Reaktionsschritte und werden daher zusammengesetzte, schrittweise oder komplexe Reaktionen genannt. In diesem Kapitel wird nicht der Versuch unternommen, die wesentlichen Besonderheiten komplexer Reaktionen einführend zu behandeln. Ausführliche Darstellungen sind der einschlägigen Fachliteratur vorbehalten [Moore and Pearson, 1981, Laidler, 1987]. Es wird vielmehr versucht anhand einer denkbar einfachsten, aber schon komplexen Reaktion exemplarisch, das Entstehen einiger herausragender Merkmale vorzuführen und daraus gegebenenfalls allgemeinere Schlussfolgerungen abzuleiten. Dies geschieht insbesondere in Hinblick auf die im Hauptteil vorgestellte Fehlfaltungsreaktion des SHaPrP(90-232) und der dabei auftretenden kinetischen Phasen (s. Kapitel 3). Diese zeigten ein augenscheinliches Zweizustandsverhalten. Die Zeitverläufe und die Konzentrationsabhängigkeit der dazugehörigen Ratenkonstanten waren jedoch nicht konsistent durch die Annahme eines elementaren Reaktionsschrittes erklärbar.

Die Wahl des Beispiels fiel auf das untenstehende Reaktionsschema



Sie ist aus mehreren Gründen motiviert. Experimentell auftretende Reaktionsordnungen, die größer zwei sind, können natürlich durch die Annahme eines Elementarschrittes, an dem drei oder mehr Reaktanten beteiligt sind, erklärt werden. Das Auftreten echter trimolekulare Reaktionen ist bestenfalls sehr unwahrscheinlich und ihre wirkliche Existenz ist umstritten [Moore and Pearson, 1981]. Das liegt daran, dass in einem infinitesimal kleinen Zeitfenster alle drei Partner gleichzeitig zusammenstoßen müssten. Setzt man ein endliches Zeitintervall voraus, so wird praktisch immer die Bildung des Trimers über ein intermediäres Dimer erfolgen. Genau diesen Vorgang beschreibt das Schema Gl. E.1. Es wird im weiteren Verlauf gezeigt, dass die Annahme bimolekularer Elementarschritte auch völlig ausreichend ist, um höhere apparente Reaktionsordnungen zu erklären.

Die komplexe Reaktion Gl. E.1 beschreibt für die Wahl $k_{-1} \gg k_1$ das kleinste denkbare Schema für Nukleationsmechanismen, denen im Rahmen der Amyloidbildung eine herausragende Rolle zugewiesen wird [Rochet and Lansbury, 2000]. Die Rolle des Nukleus kommt dabei dem Dimer **B** zu. Der zweite Reaktionsschritt folgt konsekutiv auf die Bildung des dimeren Nukleus **B**, tritt aber auch in Konkurrenz zum ersten Reaktionsschritt in Bezug auf

das Monomer **A**. Im Sinne eines minimalen Modells scheint daher eine nähere Betrachtung auch aus dieser Perspektive sinnvoll.

Das Schema wird zur Beschreibung der Faltung der Kollagentripelhelix herangezogen [Boudko et al., 2002]. Dieses Modellsystem bildet einen interessanten Komplex im Gebiet der Faltung und Assoziation oligomerer Proteine, der ja mit der Fehlfaltung von Proteinen wichtige Wesenszüge teilt [Jaenicke and Lilie, 2000].

Auch wenn Gl. E.1 ein sehr einfaches Reaktionsschema darstellt, ist es zu komplex, um das dazugehörige Differentialgleichungssystem Gl. E.2 in geschlossener analytischer Form lösen zu können.

$$\begin{aligned}\dot{a} &= -2k_1 a^2 + 2k_{-1} b - k_2 a b \\ \dot{b} &= +k_1 a^2 - k_{-1} b - k_2 a b \\ \dot{c} &= +k_2 a b\end{aligned}\tag{E.2}$$

Es wird zu Beginn der Reaktion angenommen, dass nur das Edukt **A** vorhanden ist, was in den Anfangsbedingungen

$$a(0) = a_0 \quad \text{und} \quad b(0) = c(0) = 0\tag{E.3}$$

zum Ausdruck kommt. Zusätzlich gilt natürlich die Massenerhaltung

$$a(t) + 2b(t) + 3c(t) = a_0 \quad ,\tag{E.4}$$

bzw. in differentieller Form

$$\dot{a}(t) + 2\dot{b}(t) + 3\dot{c}(t) = 0 \quad .\tag{E.5}$$

Für gegebene Werte der Raten k_1, k_{-1}, k_2 lassen sich selbstverständlich durch numerische Integration der Gleichungen die Lösungen für die Populationsdynamiken der jeweiligen chemischen Spezies berechnen. Ein anderer Weg besteht in der Anwendung von Approximationen bzw. weiterer Annahmen, die das Ableiten analytischer Lösungen ermöglichen. Dadurch können bessere Einsichten in die Abhängigkeiten der Lösungen von den Raten und der Eduktkonzentration gewonnen werden. Im Folgenden kommt die sogenannte Bodenstein-Näherung zur Anwendung [Pyun, 1971]. Es wird angenommen, dass nach einer kurzen Anlaufphase die Population des Intermediats **B** einen stationären Wert annimmt, der während des weiteren Verlaufs der Reaktion praktisch konstant bleibt. Die Bodenstein-Näherung wird deswegen auch stationäre Zustandsnäherung (SZ) genannt. Mathematisch wird dies durch die Forderung, dass die zeitliche Ableitung des Konzentrationsverlaufs $b(t)$ des Intermediats **B** für alle Zeiten verschwindet, zum Ausdruck gebracht. Die entsprechende Teilgleichung des Differentialgleichungssystems Gl. E.2 lässt sich dann explizit nach b auflösen

$$\dot{b} = 0 \quad \Leftrightarrow \quad b = \frac{k_1 a^2}{k_{-1} + k_2 a} \quad .\tag{E.6}$$

Einsetzen von Gl. E.6 in die Differentialgleichung für \dot{a} Gl. E.2 ergibt dann

$$\dot{a} = -\frac{3k_1 k_2 a^3}{k_{-1} + k_2 a} \quad .\tag{E.7}$$

Die Variablen können voneinander separiert werden

$$- dt = da \left[\frac{k_{-1}}{3k_1k_2} a^{-3} + \frac{1}{3k_1} a^{-2} \right] \quad . \quad (\text{E.8})$$

Anschließende Integration unter Berücksichtigung der Anfangsbedingungen [E.3](#) resultiert in

$$t = \frac{k_{-1}}{6k_1k_2} [a^{-2}(t) - a_0^{-2}] + \frac{1}{3k_1} [a^{-1}(t) - a_0^{-1}] \quad . \quad (\text{E.9})$$

Dieser Ausdruck kann zwar nicht analytisch nach der Monomerkonzentration $a(t)$ aufgelöst werden sehr wohl aber graphisch. Dies ist vollkommen ausreichend und im praktischen Sinne gleichwertig mit einer analytischen Invertierung. Der Vergleich mit dem allgemeinen Ausdruck für Zweizustandsreaktionen n -ter Ordnung

$$t = \frac{1}{(n-1)k} [a^{-(n-1)} - a_0^{-(n-1)}] \quad (\text{E.10})$$

ermöglicht die Interpretation der einzelnen Summanden. Der erste Summand von Gl. [E.9](#) ist äquivalent zu einer trimolekularen Reaktion, der zweite Summand entspricht dem Ausdruck für eine bimolekulare Reaktion. Die Vorfaktoren unterscheiden sich aufgrund der anderen Molekularität der komplexen Reaktion Gl. [E.1](#), was aber die vorgenommene Identifizierung nicht in Frage stellt. Die Größe des Verhältnisses k_{-1}/k_2 entscheidet darüber, welcher Term den Zeitverlauf bestimmt. Für $k_{-1}/k_2 \gg 1$ resultiert ein Kurvenverlauf entsprechend einer trimolekularen Reaktion. Ein Zeitverlauf gemäß einer bimolekularen Reaktion herrscht für $k_{-1}/k_2 \ll 1$ vor.

Ein empirisches Maß für die Reaktionsordnung ist die Änderungsgeschwindigkeit der Monomerkonzentration zu Beginn der Reaktion als Funktion der Monomerkonzentration [[Moore and Pearson, 1981](#)]. Durch Ableiten von Gl. [E.9](#) nach a und anschließender Umkehrung kann direkt der analytische Ausdruck für die Reaktionsordnung des Schemas Gl. [E.1](#) angegeben werden

$$\left| \left[\frac{da(t)}{dt} \right]_{t=0} \right| = \frac{3k_1a_0^3}{a_0 + \frac{k_{-1}}{k_2}} \quad . \quad (\text{E.11})$$

Das Verhältnisses k_{-1}/k_2 determiniert ebenfalls die zu beobachtende, apparente Reaktionsordnung. Eine Reaktionsordnung von zwei ergibt sich im Grenzfall $k_{-1}/k_2 \ll a_0$. Hingegen führt der Grenzfall $k_{-1}/k_2 \gg a_0$ auf eine Ordnung von drei. Der Zeitverlauf für die Produktkonzentration $c(t)$ kann aus der Gleichung

$$a(t) + 3c(t) = a_0 \quad , \quad (\text{E.12})$$

die nach Einsetzen der Bodenstein-Näherung ($\dot{b} = 0$) in die differentielle Form der Massenerhaltung Gl. [E.5](#) und anschließender Integration unter Berücksichtigung der Anfangsbedingungen Gl. [E.3](#) gewonnen wird, erhalten werden. Vergleich der Gleichung [E.12](#) mit der exakten Massenerhaltung Gl. [E.4](#) zeigt, dass im Rahmen der Bodenstein-Näherung die Massenerhaltung im strengen Sinne verletzt wird. Die Intermediatkonzentration $b(t)$ muss im

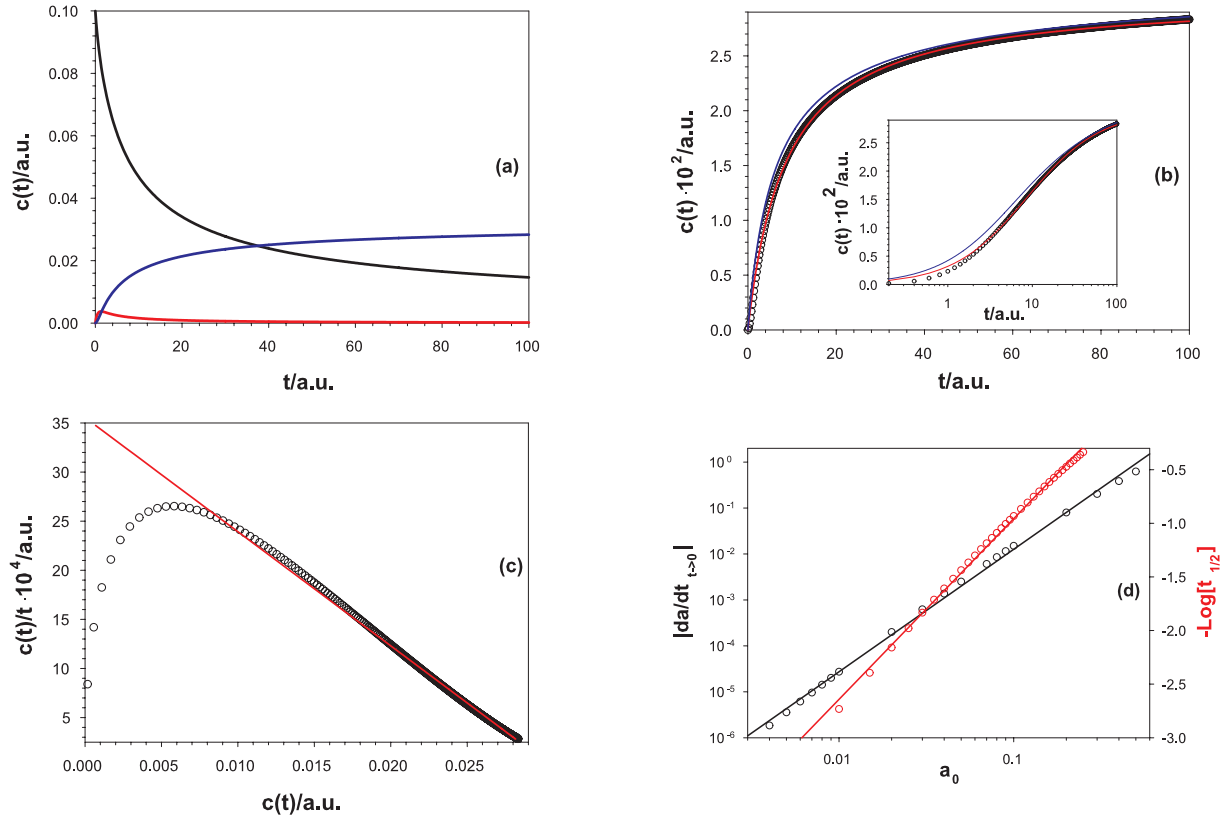


Abbildung E.1: Lösungen des Reaktionsschemas Gl. E.1 für folgende Parameter: $a_0 = 0.1$, $k_1 = 1$, $k_{-1} = 1$, $k_2 = 10$ (a) Exakte Lösung durch numerische Integration des Differentialgleichungssystems Gl. E.2 unter Verwendung des Programms MATHEMATICA [Wolfram, 2001]. Schwarz: Edukt $a(t)$; Rot: Intermediat $b(t)$; Blau: Produkt $c(t)$. (b) Vergleich der exakten Lösung für den Zeitverlauf des Produktes (\circ) mit den verschiedenen Approximationen. Blau: Bodenstein-Näherung; Rot: Anpassung einer Reaktion zweiter Ordnung (vgl. Gl. 3.2) mit $k = 0.12$ und $c(\infty) = 0.031$. Die eingefügte kleinere Abbildung zeigt die gleichen Daten auf einer semilogarithmischen Zeitskala, um die Abweichungen bei kurzen Zeiten hervorzuheben. (c) Reskalierte Auftragung, die für eine bimolekulare Reaktion zu einer linearen Abhängigkeit führt (vgl. Gl. 3.3). (\circ) exakte Lösung; (rot) Anpassung der bimolekularen Reaktion mit den Parametern aus (c). (d) Bestimmung der Reaktionsordnung n . (\circ) Bodenstein-Näherung (Gl. E.11). Lineare Regression ergibt $n = 2.67$. (\circ) Halbwertszeit der exakten numerischen Lösung ($a(t_{1/2}) = a_0/2$) als Funktion von a_0 . Lineare Regression führt auf eine Reaktionsordnung von $n = 2.69$.

Verhältnis zur eingesetzten Monomerkonzentration $a(t)$ immer sehr klein sein $b(t)/a_0 \ll 1$, damit die Bodenstein-Näherung eine sinnvolle Approximation darstellt. Die Massenerhaltung ist dann in diesem approximativen Sinne verwirklicht. Durch die Bodenstein-Näherung wird also auch ein quasi Zweizustandsverhalten der Lösungen des Reaktionsschemas erzwungen.

In Abbildung E.1 ist die exakte Lösung des Reaktionsschemas Gl. E.1 neben der approximativen Lösung gemäß der Bodenstein-Näherung dargestellt. Aus der Teilabbildung E.1 (a) kann man ersehen, dass der Intermediatverlauf $b(t)$ tatsächlich nach einer Anlaufphase quasi konstant ist. Sein maximaler Wert beträgt $b_{max}/a_0 = 3.7\%$, was die Verwendung der Bodenstein-Approximation für den verwendeten Satz an Ratenkonstanten rechtfertigt. Die exakte Lösung, die Lösung der Bodenstein-Näherung und eine Anpassung einer Reaktion zweiter Ordnung ist in Abbildung E.1(b) für den Verlauf der Produktkonzentration $c(t)$ zu sehen. Tatsächlich passt der rein bimolekulare Kurvenverlauf die exakte numerische Lösung im gezeigten Zeitbereich besser an als die Bodenstein-Approximation. Das erklärt sich aber letztlich dadurch, dass der Endwert $c(\infty)$ bei dieser Anpassung auch frei variiert wurde und leicht vom exakten Wert $1/30$ abweicht. Für kurze Zeiten erklärt die wenn auch geringe Population des Intermediatzustandes die auftretenden Abweichungen der Lösung der Bodenstein-Näherung, die aber alles in allem moderat sind. Die exakte Lösung ist in der im Hauptteil verwendeten reskalierten Auftragung in Teilabbildung E.1(c) zu sehen. Über weite Bereiche zeigt sich eine lineare Abhängigkeit. Deutliche Abweichungen treten nur für kleine Werte von $c(t)$ auf und ergeben systematisch niedrigere Werte, als die lineare Anpassung vorhersagen würde. Die experimentellen Daten (Abb. 3.8) bei der Strukturkonversion des SHaPrP(90-232) zeigen das gleiche Verhalten. Die Reaktionsordnung des Reaktionsschemas Gl. E.1 wurde in Abb. E.1(d) für die gegebenen Ratenkonstanten über einen größeren Bereich von Anfangskonzentration a_0 durch lineare Regression bestimmt. Das Resultat der Bodenstein-Näherung stimmt sehr gut mit dem Ergebnis, das aus Verwendung der exakten numerischen Lösungen folgt, überein. Es ergibt sich eine Reaktionsordnung von $n = 2.69$.

Der betrachtete Satz an Ratenkonstanten für die komplexe Reaktion Gl. E.1 führt zu einem Zeitverlauf der Produktkonzentration $c(t)$, der exzellent durch einen Kurvenverlauf einer bimolekularen Reaktion angepasst werden kann. Die zugehörige Reaktionsordnung ergibt sich aber zu $n = 2.69$ im Bereich einer Dekade um den verwendeten Wert $a_0 = 0.1$ der Monomeranfangskonzentration. Die Reaktionsordnung ist zu hoch und damit inkonsistent zum angepassten Kurvenverlauf. Genau diese Situation liegt bei den Kinetiken der Fehlfaltungsreaktion des Prion-Proteins vor (s. Kapitel 3). Das Verhalten ist die Folge eines schwach besetzten Intermediatzustandes, der auch das apparente Zweizustandsverhalten hervorbringt. Die Bodenstein-Approximation liefert genau Lösungen, die Zweizustandsverhalten aufweisen. Für den Fall des Reaktionsschemas Gl. E.1 sind analytische Ausdrücke ableitbar (Gl. E.9, E.11), die weitere Schlüsse erlauben. So ist die im Vergleich zum Kurvenverlauf zu hohe Reaktionsordnung die Konsequenz einer hohen Propagationsratenkonstante k_2 , deren Wert deutlich die Zerfallsratenkonstante k_{-1} des dimeren Intermediats übersteigt $k_2 \gg k_{-1}$.

Literaturverzeichnis

- [Abraham, 1974] Abraham, F. (1974). *Homogeneous nucleation theory: the pretransition theory of vapor condensation*. Advances in theoretical chemistry ; Supplement 1. Academic Press, New York.
- [Agashe and Udgaonkar, 1995] Agashe, V. and Udgaonkar, J. (1995). Thermodynamics of denaturation of barstar: evidence for cold denaturation and evaluation of the interaction with guanidine hydrochloride. *Biochemistry*, 34:3286–3299.
- [Aggeli et al., 2001] Aggeli, A., Nyrkova, I., Bell, M., Harding, R., Carrick, L., McLeish, T., Semenov, A., and Boden, N. (2001). Hierarchical self-assembly of chiral rod-like molecules as model for peptide β -sheet tapes, ribbons, fibrils, and fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98(21):11857–11862.
- [Alper et al., 1967] Alper, T., Cramp, W., Haig, D., and Clarke, M. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid ? *Nature*, 214:764–766.
- [Asnaghi et al., 1992] Asnaghi, D., Carpineti, M., Giglio, M., and Sozzi, M. (1992). Coagulation kinetics and aggregate morphology in the intermediate regimes between diffusion-limited and reaction-limited cluster aggregation. *Phys.Rev.sect.A*, 45:1018–1023.
- [Ballew et al., 1996] Ballew, R., Sabelko, J., and Gruebele, M. (1996). Observation of distinct nanosecond and microsecond protein folding events. *Nat. Struct. Biol.*, 3:923–926.
- [Banks et al., 1979] Banks, R. D., Blake, C. C., Evans, P. R., Haser, R., Rice, D. W., Hardy, G. W., Merrett, M., and Phillips, A. W. (1979). Sequence, structure and activity of phosphoglycerate kinase: a possible hinge-bending enzyme. *Nature*, 279(5716):773–777.
- [Baskakov et al., 2002] Baskakov, I., Legname, G., Baldwin, M., Prusiner, S., and Cohen, F. (2002). Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. *J. Biol. Chem.*, 277(24):21140–21148.
- [Baskakov et al., 2001] Baskakov, I., Legname, G., Prusiner, S., and Cohen, F. (2001). Folding of prion protein to its native α -helical conformation is under kinetic control. *J. Biol. Chem.*, 276(23):19687–19690.

- [Berne and Pecora, 1976] Berne, B. and Pecora, R. (1976). *Dynamic light scattering*. John Wiley and Sons, INC., New York.
- [Bernstein et al., 1997] Bernstein, B. E., Michels, P. A., and Hol, W. G. (1997). Synergistic effects of substrate-induced conformational changes in phosphoglycerate kinase activation. *Nature*, 385(6613):275–278.
- [Bitan et al., 2003] Bitan, G., Kirkitadze, M., Lomakin, A., Vollers, S., Benedek, G., and Teplow, D. (2003). Amyloid β -protein ($A\beta$) assembly: $A\beta$ 40 and $A\beta$ 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100(1):330–335.
- [Blackley et al., 2000] Blackley, H., Sanders, G., Davies, M., Roberts, C., Tendler, S., and Wilkinson, M. (2000). In-situ atomic force microscopy study of beta-amyloid fibrillization. *J.Mol.Biol.*, 298(5):833–840.
- [Boudko et al., 2002] Boudko, S., Frank, S., Kammerer, R., Stetefeld, J., Schulthess, T., Landwehr, R., Lustig, A., Bächtiger, H., and Engel, J. (2002). Nucleation and propagation of the collagen triple helix in single-chain and trimerized peptides: Transition from third to first order kinetics. *J. Mol. Biol.*, 317:459–470.
- [Bucciantini et al., 2002] Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C., and Stefani, M. (2002). Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*, 416:507–511.
- [Buckle et al., 1994] Buckle, A., Schreiber, G., and Fersht, A. (1994). Protein-protein recognition: Crystal structural analysis of a barnase-barstar complex at 2.0-Å resolution. *Biochemistry*, 33:8878–8889.
- [Callahan et al., 2001] Callahan, M., Xiong, L., and Caughey, B. (2001). Reversibility of scrapie-associated prion protein aggregation. *J.Biol.Chem.*, 276(30):28022–28028.
- [Cantor and Schimmel, 1980] Cantor, C. and Schimmel, P. (1980). *Techniques for the study of biological structure and function*, volume II of *Biophysical Chemistry*. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- [Caughey et al., 2001] Caughey, B., Raymond, G., Callahan, M., Wong, C., Baron, G., and Xiong, L. (2001). Interactions and conversions of prion protein isoforms. In Richards, F. and Eisenberg, D., editors, *Prion proteins*, volume 57 of *Advances in Protein Chemistry*, chapter 6, pages 139–169. Academic Press, San Diego.
- [Chandrasekhar, 1943] Chandrasekhar, S. (1943). Stochastic problems in physics and astronomy. *Rev. Mod. Phys.*, 15(1):1–89.
- [Chen et al., 1999] Chen, Z., Liang, Y., Jiang, J., Li, Y., Qian, J., and Yu, R. (1999). Determination of the number of components in mixtures using a new approach incorporating chemical information. *J. Chemometrics*, 13:15–30.

- [Chien, 1948] Chien, J. (1948). Kinetic analysis of irreversible consecutive reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 70:2256–2261.
- [Chiesa and Harris, 2001] Chiesa, R. and Harris, D. (2001). Prion diseases: what is the neurotoxic molecule? *Neurobiol. Dis.*, 8:743–763.
- [Collins, 1950] Collins, F. (1950). Diffusion in chemical reaction processes and in the growth of colloid particles. *J. Colloid Sci.*, 5:499–505.
- [Collins and Kimball, 1949] Collins, F. and Kimball, G. (1949). Diffusion-controlled reaction rates. *J. Colloid Sci.*, 4:425–437.
- [Conway et al., 2001] Conway, K., Rochet, J., Bieganski, R., and Jr., P. L. (2001). Kinetic stabilization of the α -synuclein protofibril by a dopamine- α -synuclein adduct. *Science*, 294:1346–1349.
- [Couzin, 2002] Couzin, J. (2002). In yeast, prions’ killer image doesn’t apply. *Science*, 297:758–761.
- [Damaschun et al., 2000] Damaschun, G., Damaschun, H., Fabian, H., Gast, K., Krober, R., Wieske, M., and Zirwer, D. (2000). Conversion of yeast phosphoglycerate kinase into amyloid-like structure. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, 39(3):204–211.
- [Damaschun et al., 1998] Damaschun, G., Damaschun, H., Gast, K., and Zirwer, D. (1998). Denatured states of yeast phosphoglycerate kinase. *Biochemistry Moscow*, 63(3):259–275.
- [Damaschun et al., 1999] Damaschun, G., Damaschun, H., Gast, K., and Zirwer, D. (1999). Proteins can adopt totally different folded conformations. *J. Mol. Biol.*, 291(3):715–725.
- [de Gennes, 1979] de Gennes, P. (1979). *Scaling concepts in polymer physics*. Cornell University Press, Ithaca, N.Y.
- [de la Torre and Bloomfield, 1981] de la Torre, J. G. and Bloomfield, V. (1981). Hydrodynamic properties of complex, rigid, biological macromolecules: theory and applications. *Quart. Rev. Biophys.*, 14(1):81–139.
- [Di Biasio et al., 1994] Di Biasio, A., Bolle, G., Cametti, C., Codastefano, P., Sciortino, F., and Tartaglia, P. (1994). Crossover region in the aggregation of colloids. *Phys. Rev. sect. E*, 50(2):1649–1652.
- [Dioumaev, 1997] Dioumaev, A. (1997). Evaluation of intrinsic chemical kinetics and transient product spectra from time-resolved spectroscopic data. *Biophys. Chem.*, 67(1):1–25.
- [Dobson, 2001] Dobson, C. (2001). The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 356:133–145.

- [Dobson, 2002] Dobson, C. (2002). Getting out of shape. *Nature*, 418:729–730.
- [Doi and Edwards, 1986] Doi, M. and Edwards, S. (1986). *The theory of polymer dynamics*, volume 73 of *The International Series of Monographs on Physics*. Clarendon Press, Oxford, 1. edition.
- [Dryden et al., 1992] Dryden, D. T. F., Varley, P. G., and Pain, R. H. (1992). A study of the hinge-bending mechanism of yeast 3- phosphoglycerate kinase. *Eur J Biochem*, 208(1):115–123.
- [Eaton and Hofrichter, 1990] Eaton, W. and Hofrichter, J. (1990). Sick cell hemoglobin polymerization. volume 40 of *Advances in Protein Chemistry*, chapter 2, pages 63–279. Academic Press, San Diego.
- [Eckhart and Young, 1939] Eckhart, C. and Young, G. (1939). A principal axis transformation for non-hermitian matrices. *Bull. Am. Math. Soc.*, 45:118.
- [Egolf, 2000] Egolf, D. (2000). Equilibrium regained: from nonequilibrium chaos to statistical mechanics. *Biophys. Chem.*, 287:101–104.
- [Eigen, 1996] Eigen, M. (1996). Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys. Chem.*, 63:A1–A18.
- [Ernst, 1986] Ernst, M. (1986). Kinetics of clustering in irreversible aggregation. In Pietronero, L. and Tosatti, E., editors, *Fractals in physics*, pages 289–302. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- [Esler et al., 1996] Esler, W., Stimson, E., Ghilardi, J., Vinters, H., Lee, J., Manthly, P., and Maggio, J. (1996). In vitro growth of Alzheimer’s disease β -amyloid plaques displays first-order kinetics. *Biochemistry*, 35:749–757.
- [Esler et al., 2000] Esler, W., Stimson, E., Jennings, J., Vinters, H., Lee, J. G. J., Mantyh, P., and Maggio, J. (2000). Alzheimer’s disease amyloid propagation by a template-dependent dock-lock mechanism. *Biochemistry*, 39:6288–6295.
- [Fabian and Mäntele, 2002] Fabian, H. and Mäntele, W. (2002). Infrared spectroscopy of proteins. In Chalmers, J. and Griffiths, P., editors, *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, volume 5 of *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, pages 3399–3425. John Wiley and Sons Ltd.
- [Family and Landau, 1984] Family, F. and Landau, D. (1984). *Kinetics of aggregation and gelation*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- [Feder et al., 1984] Feder, J., Jossang, T., and Rosenqvist, E. (1984). Scaling behavior and cluster fractal dimension determined by light scattering from aggregating proteins. *Phys.Rev.Letters*, 53(15):1403–1406.

- [Ferrone, 1999] Ferrone, F. (1999). Analysis of protein aggregation kinetics. In Brand, L. and Johnson, M., editors, *Amyloid, prions and other protein aggregates*, volume 309 of *Methods in Enzymology*, chapter 17, pages 256–284. Academic Press, Inc.
- [Fersht, 1995] Fersht, A. (1995). Characterizing transition states in protein folding - an essential step in the puzzle. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 5:79–84.
- [Fersht, 1998] Fersht, A. (1998). *Structure and mechanism in protein science*. W.H. Freeman and Company, New York.
- [Fink, 1998] Fink, A. (1998). Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold. Des.*, 3:R9–R23.
- [Fink et al., 1994] Fink, A., Calciano, L., Goto, Y., Kurotsu, T., and Palleros, D. (1994). Classification of acid denaturation of proteins: intermediates and unfolded states. *Biochemistry*, 33:12504–12511.
- [Flory, 1953] Flory, P. (1953). *Principles of polymer chemistry*. The George Fisher Baker non-resident lectureship in chemistry at Cornell University. Cornell University Press, Ithaca.
- [Friedlander, 2000] Friedlander, S. (2000). *Smoke, dust and haze fundamentals of aerosol dynamics*. Topics in chemical engineering. Oxford University Press, New York, 2. edition.
- [Gabdouline and Wade, 1997] Gabdouline, R. and Wade, R. (1997). Simulation of the diffusional association of barnase and barstar. *Biophys. J.*, 72:1917–1929.
- [Gast et al., 1992] Gast, K., Damaschun, G., Misselwitz, R., and Zirwer, D. (1992). Application of dynamic light scattering to studies of protein folding kinetics. *Eur. Biophys. J.*, 21:357–362.
- [Gast et al., 1994] Gast, K., Damaschun, H., Misselwitz, R., Muller, F. M., Zirwer, D., and Damaschun, G. (1994). Compactness of protein molten globules: temperature-induced structural changes of the apomyoglobin folding intermediate. *Eur. Biophys. J.*, 23(4):297–305.
- [Gast et al., 2003] Gast, K., Modler, A., Damaschun, H., Kröber, R., Lutsch, G., Zirwer, D., Golbik, R., and Damaschun, G. (2003). Effect of enviromental conditions on aggregation and fibril formation of barstar. *Eur. Biophys. J.*, in Press.
- [Gedde, 1999] Gedde, U. (1999). *Polymer Physics*. Topics in chemical engineering. Kluwer Academic Publishers, 1. edition.
- [Glockshuber, 2001a] Glockshuber, R. (2001a). Die biophysikalische Charakterisierung des zellulären Prion-Proteins PrP^c. In Hörnlimann, B., Riesner, D., and Kretzschmar, H., editors, *Prionen und Prionenkrankheiten*, chapter 5, pages 61–68. De Gruyter, Berlin.

- [Glockshuber, 2001b] Glockshuber, R. (2001b). Folding dynamics and energetics of recombinant prion proteins. In Richards, F. and Eisenberg, D., editors, *Prion proteins*, volume 57 of *Advances in Protein Chemistry*, chapter 4, pages 83–105. Academic Press, San Diego.
- [Golbik et al., 1999] Golbik, R., Fischer, G., and Fersht, A. (1999). Folding of barstar c40a/c82a/p27a and catalysis of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerization by human cytosolic cyclophilin (cyp18). *Protein Sci.*, 8:1505–1514.
- [Goldsbury et al., 2000] Goldsbury, C., Wirtz, S., Muller, S., Sunderji, S., Wicki, P., Aebi, U., and Frey, P. (2000). Studies on the in vitro assembly of a beta 1-40: Implications for the search for a beta fibril formation inhibitors. *J. Struct. Biol.*, 130(2-3):217–231.
- [Griffith, 1967] Griffith, J. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature*, 215:1043–1044.
- [Griffiths, 1975] Griffiths, P. (1975). *Chemical infrared fourier transform spectroscopy*. John Wiley and Sons, INC., New York.
- [Guijarro et al., 1998] Guijarro, J., Sunde, M., Jones, J., Campbell, I., and Dobson, C. (1998). Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95(8):4224–4228.
- [Guillet et al., 1993] Guillet, V., Laphorn, A., Hartley, R., and Mauguén, Y. (1993). Recognition between a bacterial ribonuclease, barnase, and its natural inhibitor, barstar. *Structure*, 1:165–176.
- [Häggqvist et al., 1999] Häggqvist, B., Näslund, J., Sletten, K., Westermark, G., Mucchiano, G., Tjernberg, L., Nordstedt, C., Engström, U., and Westermark, P. (1999). Medin: an integral fragment of aortic smooth muscle cell-produced lactadherin forms the most common human amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:8669–8674.
- [Hammarström et al., 2002] Hammarström, P., Wiseman, R., Powers, E., and Kelly, J. (2002). Prevention of transthyretin amyloid disease by changing protein misfolding energetics. *Science*, 299:713–716.
- [Hardy and Higgins, 1989] Hardy, J. and Higgins, G. (1989). Alzheimer’s disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256:184–185.
- [Harper et al., 1997a] Harper, J., Lieber, C., and Lansbury, P.T., J. (1997a). Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the alzheimer’s disease amyloid-beta protein. *Chem. Biol.*, 4(12):951–959.
- [Harper et al., 1997b] Harper, J., Wong, S., Lieber, C., and Lansbury, P.T., J. (1997b). Observation of metastable a beta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem. Biol.*, 4(2):119–125.

- [Hartley, 1989] Hartley, R. (1989). Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together. *Trends Biochem. Sci.*, 14:450–454.
- [Hashimoto et al., 1998] Hashimoto, M., Hsu, L., Sisk, A., Xia, Y., Takeda, A., Sundsmo, M., and Masliah, E. (1998). Human recombinant NACP/ α -synuclein is aggregated and fibrillated in vitro: relevance for Lewy body disease. *Brain Res.*, 799:301–306.
- [Henry and Hofrichter, 1992] Henry, E. and Hofrichter, J. (1992). Singular value decomposition: Application to analysis of experimental data. In Brand, L. and Johnson, M., editors, *Numerical Computer Methods*, volume 210 of *Methods in Enzymology*, chapter 8, pages 129–688. Academic Press, Inc.
- [Hofmeister, 1902] Hofmeister, F. (1902). Über Bau und Gruppierung der Eiweisskörper. *Ergeb. Physiol.*, 1:759–802.
- [Hörnlimann, 2001] Hörnlimann, B. (2001). Historische Einführung: Prionen und Prionenkrankheiten. In Hörnlimann, B., Riesner, D., and Kretzschmar, H., editors, *Prionen und Prionenkrankheiten*, chapter 1, pages 1–20. De Gruyter, Berlin.
- [Hotelling, 1933] Hotelling, H. (1933). Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *J. Educ. Psych.*, 24:417.
- [Hoyer et al., 2002] Hoyer, W., Antony, T., Cherny, D., Heim, G., Jovin, T., and Subramaniam, V. (2002). Dependence of α -synuclein aggregate morphology on solution conditions. *J. Mol. Biol.*, 322:383–393.
- [I.N.Bronstein and K.A.Semendjajew, 1989] I.N.Bronstein and K.A.Semendjajew (1989). *Taschenbuch der Mathematik*. Verlag Harri Deutsch, Thun und Frankfurt/Main.
- [Islam et al., 2002] Islam, S., Karplus, M., and Weaver, D. (2002). Application of the diffusion-collision model to the folding of three-helix bundle proteins. *J. Mol. Biol.*, 318:199–215.
- [Jackson et al., 1999] Jackson, G., Hill, A., Joseph, C., Hosszu, L., Power, A., Waltho, J., Clarke, A., and Collinge, J. (1999). Multiple folding pathways for heterologously expressed human prion protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 1431:1–13.
- [Jaenicke, 1999] Jaenicke, R. (1999). Stability and folding of domain proteins. *Progress In Biophysics And Molecular Biology*, 71(2):155–241.
- [Jaenicke and Lilie, 2000] Jaenicke, R. and Lilie, H. (2000). Folding and association of oligomeric and multimeric proteins. *Adv. Protein Chem.*, 53:329–401.
- [Jaenicke and Seckler, 1997] Jaenicke, R. and Seckler, R. (1997). Protein misassembly in vitro. *Adv. Protein Chem.*, 50:1–59.

- [Janowski et al., 2001] Janowski, R., Kozak, M., Jankowska, E., Grzonka, Z., Grubb, A., Abrahamson, M., and Jaskolski, M. (2001). Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. *Nat. Struct. Biol.*, 8:316–320.
- [Jarrett and Lansbury, 1993] Jarrett, J. and Lansbury, P.T., J. (1993). Seeding one-dimensional crystallization of amyloid: A pathogenic mechanism in alzheimer’s disease and scrapie? *Cell*, 73:1055–1058.
- [Johnson, 1990] Johnson, W. (1990). Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, 7:205–214.
- [Jossang et al., 1985] Jossang, T., Feder, J., and Rosenqvist, E. (1985). Heat aggregation kinetics of human IgG. *J.Chem.Phys.*, 82(1):574–589.
- [Juneja et al., 2002] Juneja, J., Bhavesh, N., Udgaonkar, J., and Hosur, R. (2002). NMR identification and characterization of the flexible regions in the 160 kDa molten globule-like aggregate of barstar at low pH. *Biochemistry*, 41:9885–9899.
- [Kad et al., 2003] Kad, N., Myers, S., Smith, D., Smith, D., Radford, S., and Thomson, N. (2003). Hierarchical assembly of β_2 -microglobulin amyloid in vitro revealed by atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.*, 330:785–797.
- [Karplus and Weaver, 1976] Karplus, M. and Weaver, D. (1976). Protein-folding dynamics. *Nature*, 260(5550):404–406.
- [Karplus and Weaver, 1979] Karplus, M. and Weaver, D. (1979). Diffusion-collision model for protein folding. *Biopolymers*, 18:1421–1437.
- [Karplus and Weaver, 1994] Karplus, M. and Weaver, D. (1994). Protein-folding dynamics: the diffusion-collision model and experimental data. *Protein Sci.*, 3:650–668.
- [Kayed et al., 2003] Kayed, R., Head, E., Thompson, J., McIntire, T., Milton, S., Cotman, C., and Glabe, C. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 300:486–489.
- [Khurana et al., 1995] Khurana, R., Hate, A., Nath, U., and Udgaonkar, J. (1995). pH dependence of the stability of barstar to chemical and thermal denaturation. *Protein Sci.*, 4:1133–1144.
- [Khurana and Udgaonkar, 1994] Khurana, R. and Udgaonkar, J. (1994). Equilibrium unfolding studies of barstar: Evidence for an alternative conformation which resembles a molten globule. *Biochemistry*, 33:106–115.
- [Kiefhaber et al., 1991] Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H., and Buchner, J. (1991). Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Bio/Technology*, 9:825–829.

- [Kirkitadze et al., 2002] Kirkitadze, M., Bitan, G., and Teplow, D. (2002). Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: the emerging role of oligomeric assemblies. *J. Neurosci. Res.*, 69:567–577.
- [Klein et al., 2001] Klein, W., Krafft, G., and Finch, C. (2001). Targeting small A β oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum ? *Trends Neurosci.*, 24(4):219–224.
- [Koppel, 1972] Koppel, D. (1972). Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: the method of cumulants. *J. Chem. Phys.*, 57:4814–4820.
- [Krimm, 1962] Krimm, S. (1962). Infrared spectra and chain conformation of proteins. *J. Mol. Biol.*, 4:528–540.
- [Kusumoto et al., 1998] Kusumoto, Y., Lomakin, A., Teplow, D., and Benedek, G. (1998). Temperature dependence of amyloid beta-protein fibrillization. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:12277–12282.
- [Kyriakidis et al., 1997] Kyriakidis, A., Yiantsios, S., and Karabelas, A. (1997). A study of colloidal particle brownian aggregation by light scattering techniques. *J. Colloid Interf. Sci.*, 195(2):299–306.
- [Laidler, 1987] Laidler, K. (1987). *Chemical Kinetics*. Harper and Row, Publishers, Inc., New York, 3. edition.
- [Lashuel et al., 2002] Lashuel, H., Hartley, D., Petre, B., Walz, T., and Jr., P. L. (2002). Amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature*, 418:291.
- [Lashuel et al., 2000] Lashuel, H., LaBrenz, S., Woo, L., Serpell, L., and Kelly, J. (2000). Protofilaments, filaments, ribbons, and fibrils from peptidomimetic self-assembly: implications for amyloid fibril formation and materials science. *J. Am. Chem. Soc.*, 122:5262–5277.
- [Lee and Timasheff, 1977] Lee, J. and Timasheff, S. (1977). In vitro reconstitution of calf brain microtubules: effects of solution variables. *Biochemistry*, 16(8):1754–1764.
- [Lin et al., 1989] Lin, M., Lindsay, H., Weitz, D., Ball, R., Klein, R., and Meakin, P. (1989). Universality in colloid aggregation. *Nature*, 339:360–362.
- [Lin et al., 1990a] Lin, M., Lindsay, H., Weitz, D., Ball, R., Klein, R., and Meakin, P. (1990a). Universal reaction-limited colloid aggregation. *Phys. Rev. sect. A*, 41(4):2005–2020.
- [Lin et al., 1990b] Lin, M., Lindsay, H., Weitz, D., Klein, R., Ball, R., and Meakin, P. (1990b). Universal diffusion-limited colloid aggregation. *J. Phys. Cond. Matter*, 2(13):3093–3113.

- [Liu et al., 1999] Liu, H., Farr-Jones, S., Ulyanov, N., Llinas, M., Marquee, S., Groth, D., Cohen, F., Prusiner, S., and James, T. (1999). Solution structure of syrian hamster prion protein rPrP(90-231). *Biochemistry*, 38:5362–5377.
- [Liu et al., 2001] Liu, Y., Grotte, G., Libonati, M., and Eisenberg, D. (2001). A domain-swapped RNase A dimer with implications for amyloid formation. *Nat. Struct. Biol.*, 8:211–214.
- [Lomakin et al., 1996] Lomakin, A., Chung, D., Benedek, G., Kirschner, D., and Teplow, D. (1996). On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 93(3):1125–1129.
- [Lomakin et al., 1997] Lomakin, A., Teplow, D., Kirschner, D., and Benedek, G. (1997). Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid beta-protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 94(15):7942–7947.
- [Lu and Chang, 2002] Lu, B. and Chang, J. (2002). Isolation and characterization of a polymerized prion protein. *Biochem. J.*, 364:81–87.
- [Lubienski et al., 1994] Lubienski, M., Bycroft, M., Freund, S., and Fersht, A. (1994). Three-dimensional solution structure and ^{13}C assignments of barstar using nuclear magnetic spectroscopy. *Biochemistry*, 33:8866–8877.
- [Lumry and Eyring, 1954] Lumry, R. and Eyring, H. (1954). Conformational changes of proteins. *J. Phys. Chem.*, 58:110–120.
- [Malinowski, 1977a] Malinowski, E. (1977a). Determination of the number of factors and the experimental error in a data matrix. *Anal. Chem.*, 49(4):612–617.
- [Malinowski, 1977b] Malinowski, E. (1977b). Theory of error in factor analysis. *Anal. Chem.*, 49(4):606–612.
- [Malinowski, 2002] Malinowski, E. (2002). *Factor analysis*. Wiley-Interscience, New York, 3. edition.
- [Mallamace et al., 1999] Mallamace, F., Scolaro, L., Romeo, A., and Micali, N. (1999). Crossover in the kinetic growth process of porphyrin aggregation. *Phys.Rev.Letters*, 82(17):3480–3483.
- [Mandelbrot, 1983] Mandelbrot, B. (1983). *The fractal geometry of nature*. W.H. Freeman, San Francisco, updated and augmented edition.
- [Mauser, 1974] Mauser, H. (1974). *Formale Kinetik*. Bertelsmann Universitätsverlag, Düsseldorf, 1. edition.
- [Meloun et al., 2000] Meloun, M., Capek, J., Miksik, P., and Brereton, R. (2000). Critical comparison of methods predicting the number of components in spectroscopic data. *Anal. Chim. Acta*, 423:51–68.

- [Modler et al., 2003] Modler, A., Gast, K., Lutsch, G., and Damaschun, G. (2003). Assembly of amyloid protofibrils via critical oligomers—a novel pathway of amyloid formation. *J. Mol. Biol.*, 325(1):135–148.
- [Moore and Pearson, 1981] Moore, J. and Pearson, R. (1981). *Kinetics and Mechanism*. John Wiley and Sons, INC., New York, 3. edition.
- [Morillas et al., 2001] Morillas, M., Vanik, D., and Surewicz, W. (2001). On the mechanism of α -helix to β -sheet transition in the recombinant prion protein. *Biochemistry*, 40(23):6982–6987.
- [Murphy and Pallitto, 2000] Murphy, R. and Pallitto, M. (2000). Probing the kinetics of beta-amyloid self-association. *J. Struct. Biol.*, 130:109–122.
- [Nölting, 1999] Nölting, B. (1999). *Protein folding kinetics (Biophysical methods)*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [Nölting et al., 1995] Nölting, B., Golbik, R., and Fersht, A. (1995). Submillisecond events in protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:10668–10672.
- [Nölting et al., 1997] Nölting, B., Golbik, R., Neira, J., Soler-Gonzalez, A., Schreiber, G., and Fersht, A. (1997). The folding pathway of a protein at high resolution from microseconds to seconds. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:826–830.
- [Nolting, 1993a] Nolting, W. (1993a). *Quantenmechanik Teil 2: Methoden und Anwendungen*, volume 5 of *Grundkurs. Theoretische Physik*. Verlag Zimmermann-Neuanfang, Ulmen, 1. edition.
- [Nolting, 1993b] Nolting, W. (1993b). *Statistische Physik*, volume 6 of *Grundkurs. Theoretische Physik*. Verlag Zimmermann-Neuanfang, Ulmen, 1. edition.
- [Nöppert, 1997] Nöppert, A. (1997). *Stopped-flow dynamische Lichtstreuung zur Untersuchung des Proteinfaltungsprozesses: Ribonuclease A und Phosphoglyceratkinase als Modellproteine*. PhD thesis, Institut für Biophysik, HU Berlin, Berlin.
- [Northrup and Erickson, 1992] Northrup, S. and Erickson, H. (1992). Kinetics of protein-protein-association explained by brownian dynamics computer simulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89:3338–3342.
- [Odriozola et al., 2001a] Odriozola, G., Moncho-Jorda, A., Schmitt, A., Callejas-Fernandez, J., Martinez-Garcia, R., and Hidalgo-Alvarez, R. (2001a). A probabilistic aggregation kernel for the computer-simulated transition from DLCA to RLCA. *Europhys.Letters*, 53(6):797–803.
- [Odriozola et al., 1999] Odriozola, G., Schmitt, A., Callejas-Fernandez, J., Martinez-Garcia, R., and Hidalgo-Alvarez, R. (1999). Dynamic scaling concepts applied to numerical solutions of smoluchowski’s rate equation. *J.Chem.Phys.*, 111(16):7657–7667.

- [Odrizola et al., 2001b] Odrizola, G., Tirado-Miranda, M., Schmitt, A., Lopez, F., Callejas-Fernandez, J., Martinez-Garcia, R., and Hidalgo-Alvarez, R. (2001b). A light scattering study of the transition region between diffusion- and reaction-limited cluster aggregation. *J. Colloid Interf. Sci.*, 240(1):90–96.
- [Olivier and Sorensen, 1990] Olivier, B. and Sorensen, C. (1990). Variable aggregation rates in colloidal gold - kernel homogeneity dependence on aggregant concentration. *Phys. Rev. sect. A*, 41(4):2093–2100.
- [Oosawa and Asakura, 1975] Oosawa, F. and Asakura, S. (1975). *Thermodynamics of the polymerization of protein*. Molecular biology. Academic Press, London.
- [Overbeek, 1952] Overbeek, J. (1952). Kinetics of flocculation. In Kruyt, H., editor, *Irreversible Systems*, volume 1 of *Colloid Science*, chapter 7, pages 278–301. Elsevier Publishing Company.
- [Padrick and Miranker, 2002] Padrick, S. and Miranker, A. (2002). Islet amyloid: phase partitioning and secondary nucleation are central to the mechanism of fibrillogenesis. *Biochemistry*, 41:4694–4703.
- [Pallitto and Murphy, 2001] Pallitto, M. and Murphy, R. (2001). A mathematical model of the kinetics of beta-amyloid fibril growth from the denatured state. *Biophys. J.*, 81:1805–1822.
- [Pepys, 2001] Pepys, M. (2001). Pathogenesis, diagnosis and treatment of systemic amyloidosis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 356:203–211.
- [Perutz et al., 2002] Perutz, M., Finch, J., Berriman, J., and Lesk, A. (2002). Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99(8):5591–5595.
- [Perutz et al., 1994] Perutz, M., Johnson, T., Suzuki, M., and Finch, J. (1994). Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:5355–5358.
- [Poirier et al., 2002] Poirier, M., Lin, H., Macosko, J., Cai, S., and Amzel, M. (2002). Huntingtin spheroids and protofibrils as precursors in polyglutamine fibrillization. *J. Biol. Chem.*, 277(43):41032–41037.
- [Pötzsch and Sommer, 2003] Pötzsch, O. and Sommer, B. (2003). *Bevölkerung Deutschlands 2050 - Ergebnisse der 10. koordinierten Bevölkerungsvorausberechnung*. Statistisches Bundesamt, Pressestelle, Wiesbaden.
- [Press et al., 1992] Press, W., Teukolsky, S., Vetterling, W., and Flannery, B. (1992). *Numerical Recipes in C*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2ed. edition.

- [Provencher, 1982a] Provencher, S. (1982a). A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. *Com. Phys. Commun.*, 27:213–227.
- [Provencher, 1982b] Provencher, S. (1982b). Contin - a general-purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral-equations. *Com. Phys. Commun.*, 27:229–242.
- [Prusiner, 1982] Prusiner, S. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216:136–144.
- [Prusiner, 1991] Prusiner, S. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science*, 252(5012):1515–1522.
- [Prusiner, 1997] Prusiner, S. (1997). Prion diseases and the BSE crisis. *Science*, 278:245–251.
- [Prusiner, 2001a] Prusiner, S. (2001a). Die Geschichte der Erforschung von Prionen. In Hörnlimann, B., Riesner, D., and Kretzschmar, H., editors, *Prionen und Prionenkrankheiten*, chapter 3, pages 36–49. De Gruyter, Berlin.
- [Prusiner, 2001b] Prusiner, S. (2001b). Shattuck lecture - neurodegenerative diseases and prions. *New Engl. J. Med.*, 344(20):1516–1526.
- [Ptitsyn, 1995] Ptitsyn, O. (1995). Molten globule and protein folding. *Adv. Protein Chem.*, 47:83–229.
- [Ptitsyn and Rashin, 1973] Ptitsyn, O. and Rashin, A. (1973). Stages in the mechanism of self-organization of protein molecules. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, 210:1213–1215.
- [Pyun, 1971] Pyun, C. (1971). Steady-state and equilibrium approximations in chemical kinetics. *J. Chem. Edu.*, 48:194–196.
- [Reches and Gazit, 2003] Reches, M. and Gazit, E. (2003). Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes. *Science*, 300:625–627.
- [Richardson and Richardson, 2002] Richardson, J. and Richardson, D. (2002). Natural β -sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99(5):2754–2759.
- [Riesner, 2001] Riesner, D. (2001). Die Scrapie-Isoform des Prion-Proteins PrP^{Sc} im Vergleich zur zellulären Isoform PrP^c. In Hörnlimann, B., Riesner, D., and Kretzschmar, H., editors, *Prionen und Prionenkrankheiten*, chapter 8, pages 81–91. De Gruyter, Berlin.
- [Roberts, 2003] Roberts, C. (2003). Kinetics of irreversible protein aggregation: analysis of extended Lumry-Eyring models and implication for predicting protein shelf life. *J. Phys. Chem. B*, 107:1194–1207.

- [Rochet and Lansbury, 2000] Rochet, J. and Lansbury, P. (2000). Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10(1):60–68.
- [Ruelle, 2001] Ruelle, D. (2001). A departure from equilibrium. *Nature*, 414:263–265.
- [Saeger and Röcken, 1998] Saeger, W. and Röcken, C. (1998). Amyloid: Mikroskopischer Nachweis, Klassifikation und klinischer Bezug. *Pathologe*, 19(5):345–354.
- [Sanchez et al., 2003] Sanchez, I., Mahlke, C., and Yuan, J. (2003). Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. *Nature*, 421:373–379.
- [Schätzl et al., 1995] Schätzl, H., Costa, M. D., Taylor, L., Cohen, F., and Prusiner, S. (1995). Prion protein gene variation among primates. *J. Mol. Biol.*, 245:362–374.
- [Scheele and Schuster, 1974] Scheele, R. and Schuster, T. (1974). Kinetics of protein subunit interactions: simulation of a polymerization overshoot. *Biopolymers*, 13:275–288.
- [Scheibel et al., 2003] Scheibel, T., Parthasarathy, R., Sawicki, G., Lin, X., Jaeger, H., and Lindquist, S. (2003). Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100(8):4527–4532.
- [Schilow and Oliveberg, 1997] Schilow, M. and Oliveberg, M. (1997). Transient aggregates in protein folding are easily mistaken for folding intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:6084–6086.
- [Schmitt et al., 2000] Schmitt, A., Odriezola, G., Moncho-Jorda, A., Callejas-Fernandez, J., Martinez-Garcia, R., and Hidalgo-Alvarez, R. (2000). Multiple contact kernel for diffusionlike aggregation. *Phys. Rev. sect. E*, 62(6):8335–8343.
- [Schmitz, 1990] Schmitz, K. (1990). *An introduction to dynamic light scattering by macromolecules*. Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1. edition.
- [Schreiber and Fersht, 1996] Schreiber, G. and Fersht, A. (1996). Rapid, electrostatically assisted association of proteins. *Nat. Struct. Biol.*, 3(5):427–431.
- [Schüler et al., 1999] Schüler, J., Frank, J., Saenger, W., and Georgalis, Y. (1999). Thermally induced aggregation of human transferrin receptor studied by light-scattering techniques. *Biophys. J.*, 77(1117-1125):427–431.
- [Selkoe, 2001] Selkoe, D. (2001). Alzheimer’s disease: Genes, proteins, and therapy. *Physiol. Reviews*, 81(2):741–766.
- [Selkoe, 2002] Selkoe, D. (2002). Alzheimer’s disease is a synaptic failure. *Science*, 298:789–791.
- [Serag et al., 2002] Serag, A., Altenbach, ., Gingery, M., Hubbell, W., and Yeates, T. (2002). Arrangement of subunits and ordering of β -strands in an amyloid sheet. *Nat. Struct. Biol.*, 9(10):734–739.

- [Serio et al., 2000] Serio, T., Cashikar, A., Kowal, A., Sawicki, G., Moslehi, J., Serpell, L., Arnsdorf, M., and Lindquist, S. (2000). Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science*, 289(5483):1317–1321.
- [Serio and Lindquist, 2001] Serio, T. and Lindquist, S. (2001). $[PSI^+]$, *SUP35*, and chaperones. In Richards, F. and Eisenberg, D., editors, *Prion proteins*, volume 57 of *Advances in Protein Chemistry*, chapter 3, pages 335–366. Academic Press, San Diego.
- [Shastry and Udgaonkar, 1995] Shastry, M. and Udgaonkar, J. (1995). The folding mechanism of barstar: evidence for multiple pathways and multiple intermediates. *J. Mol. Biol.*, 247:1013–1027.
- [Shen and Murphy, 1995] Shen, C. and Murphy, R. (1995). Solvent effects on self-assembly of beta-amyloid peptide. *Biophys. J.*, 69:640–651.
- [Shrager and Hendler, 1982] Shrager, R. and Hendler, R. (1982). Titration of individual components in a mixture with resolution of difference spectra, pks, and redox transitions. *Anal. Chem.*, 54(7):1147–1152.
- [Sipe and Cohen, 2000] Sipe, J. and Cohen, A. (2000). Review: history of the amyloid fibril. *J. Struct. Biol.*, 130:88–98.
- [Smoluchowski, 1916] Smoluchowski, M. (1916). Drei Vorträge über Diffusion, Brownsche Molekularbewegung und Koagulation von Kolloidteilchen. *Phys. Z.*, 17:557–599.
- [Smoluchowski, 1917] Smoluchowski, M. (1917). Versuch einer mathematischen Theorie der Koagulationskinetik kolloider Lösungen. *Z. Phys. Chem.*, 92:129–168.
- [Sokolowski et al., 2003] Sokolowski, F., Modler, A., Masuch, R., Zirwer, D., Baier, M., Lutsch, G., Moss, D., Gast, K., and Naumann, D. (2003). Formation of critical oligomers is a key event during conformational transition of recombinant Syrian hamster prion protein. *J. Biol. Chem.*, 278:40481–40492.
- [Soto, 2002] Soto, C. (2002). Altering prion replication for therapy and diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies. *Biochem. Soc. Trans.*, 30(4):569–574.
- [Speed et al., 1997] Speed, M., King, J., and Wang, D. (1997). Polymerization mechanism of polypeptide chain aggregation. *Biotechnol. Bioeng.*, 54(4):333–343.
- [Springer, 1970] Springer, J. (1970). *Einführung in die Theorie der Lichtstreuung verdünnter Lösungen großer Moleküle*. Applied Research Laboratories, Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, Berlin-Dahlem.
- [Staudinger, 1920] Staudinger, H. (1920). Über Polymerisation. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 53:1073.

- [Stöckel et al., 1998] Stöckel, J., J.Safar, Wallace, A., Cohen, F., and Prusiner, S. (1998). Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry*, 37:7185–7193.
- [Sunde and Blake, 1998] Sunde, M. and Blake, C. (1998). From the globular to the fibrous state: protein structure and structural conversion in amyloid formation. *Quart. Rev. Biophys.*, 31(1):1–39.
- [Swietnicki et al., 2000] Swietnicki, W., Morillas, M., Chen, S., Gambetti, P., and Surewicz, W. (2000). Aggregation and fibrillization of the recombinant human prion protein huPrP90-231. *Biochemistry*, 39(2):424–431.
- [Swietnicki et al., 1997] Swietnicki, W., Petersen, R., Gambetti, P., and Surewicz, W. (1997). pH-dependent stability and conformation of the recombinant human prion protein huPrP(90-231). *J. Biol. Chem.*, 272(44):27517–27520.
- [Tanford and Reynolds, 2001] Tanford, C. and Reynolds, J. (2001). *Nature's robots*. Oxford University Press Inc., New York, 1. edition.
- [Temussi et al., 2003] Temussi, P., Masino, L., and Pastore, A. (2003). From Alzheimer to Huntington: why is a structural understanding so difficult? *EMBO J.*, 22(3):355–361.
- [Thirmualai et al., 2003] Thirmualai, D., Klimov, D., and Dima, R. (2003). Emerging ideas on the molecular basis of protein and peptide aggregation. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 13(2):1–14.
- [Thunecke et al., 1998] Thunecke, M., Lobbia, A., Kosciessa, U., Dyrks, T., Oakley, A., Turner, J., Saenger, W., and Georgalis, Y. (1998). Aggregation of a beta alzheimer's disease-related peptide studied by dynamic light scattering. *J.Pept.Res.*, 52(6):509–517.
- [Tomski and Murphy, 1992] Tomski, S. and Murphy, R. (1992). Kinetics of aggregation of synthetic beta-amyloid peptide. *Arch.Biochem.Biophys.*, 294(2):630–638.
- [Umbach et al., 1998] Umbach, P., Georgalis, Y., and Saenger, W. (1998). Time-resolved small-angle static light scattering on lysozyme during nucleation and growth. *J.Am.Chem.Soc.*, 120(10):2382–2390.
- [van Dongen and Ernst, 1985a] van Dongen, P. and Ernst, M. (1985a). Cluster size distribution in irreversible aggregation at large times. *J.Phys.sect.A: Math.Gen.*, 18:2779–2793.
- [van Dongen and Ernst, 1985b] van Dongen, P. and Ernst, M. (1985b). Dynamic scaling in the kinetics of clustering. *Phys.Rev.Letters*, 54(13):1396–1399.
- [van Holde, 2003] van Holde, K. (2003). Reflections on a century of protein chemistry. *Biophys. Chem.*, 100:71–79.

- [Vicsek, 1992] Vicsek, T. (1992). *Fractal growth phenomena*. World Scientific, Singapore, 2. edition.
- [Virchow, 1854] Virchow, R. (1854). Zur Cellulose-Frage. *Virchows Arch.*, 6:415–426.
- [Volles et al., 2001] Volles, M., Lee, S., Rochet, J., Shtilerman, M., Ding, T., Kessler, J., and Jr., P. (2001). Vesicle permeabilization by protofibrillar α -Synuclein: Implications for the Pathogenesis and Treatment of Parkinson's Disease. *Biochemistry*, 40:7812–7819.
- [Walsh et al., 1997] Walsh, D., Lomakin, A., Benedek, G., Condron, M., and Teplow, D. (1997). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. detection of a protofibrillar intermediate. *J.Biol.Chem.*, 272(35):22364–22372.
- [Wanker, 2000] Wanker, E. (2000). Protein aggregation in Huntington's and Parkinson's disease: implications for therapy. *Mol. Med. Today*, 6:387–390.
- [Watson et al., 1982] Watson, H. C., Walker, N., Shaw, P., Bryant, T., Wendell, P., Fothergill, L., Perkins, R., Conroy, S., Dobson, M., Tuite, M., Kingsman, A., and Kingsman, S. (1982). Sequence and structure of yeast phosphoglycerate kinase. *Embo J.*, 1(12):1635–1640.
- [Weissmann et al., 2001] Weissmann, C., Flechsig, E., Raeber, A., Cozzio, A., and Aguzzi, A. (2001). Modifizierte Mäuse in der Prionenforschung. In Hörnlimann, B., Riesner, D., and Kretzschmar, H., editors, *Prionen und Prionenkrankheiten*, chapter 10, pages 103–116. De Gruyter, Berlin.
- [Wille et al., 2002] Wille, H., Michelitsch, M., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F., Agard, D., and Prusiner, S. (2002). Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99(6):3563–3568.
- [Wisnudel and Torkelson, 1996] Wisnudel, M. and Torkelson, J. (1996). Effect of chain length on rates of diffusion-limited small molecule-polymer and polymer-polymer reactions: phosphorescence quenching studies. *J. Polym. Sci. Part B: Polymer Physics*, 34:2999–3008.
- [Wolfram, 2001] Wolfram, S. (2001). *The Mathematica Book*. Wolfram Research, Inc., Champaign, IL USA, 4. edition.
- [Wong et al., 1996] Wong, K., Freund, S., and Fersht, A. (1996). Cold denaturation of barstar: 1h, 15n, 13c nmr assignment and characterisation of residual structure. *J. Mol. Biol.*, 259:805–818.
- [Wood et al., 1999] Wood, S., Wypych, J., Steavenson, S., Louis, J., Citron, M., and Biere, A. (1999). α -synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. *J. Biol. Chem.*, 274:19509–19512.

- [Wüthrich and Riek, 2001] Wüthrich, K. and Riek, R. (2001). Three-dimensional structures of prion proteins. In Richards, F. and Eisenberg, D., editors, *Prion proteins*, volume 57 of *Advances in Protein Chemistry*, chapter 3, pages 55–82. Academic Press, San Diego.
- [Xu et al., 2001] Xu, S., Bevis, B., and Arnsdorf, M. (2001). The assembly of amyloidogenic yeast sup35 as assessed by scanning (atomic) force microscopy: an analogy to linear colloidal aggregation ? *Biophys. J.*, 81(1):446–454.
- [Yamakawa, 1971] Yamakawa, H. (1971). *Modern theory of polymer solutions*. Harpers Chemistry Series. Harper and Row, New York.
- [Young et al., 1993] Young, L. D., Fink, A., and Dill, K. (1993). Aggregation of globular proteins. *Accs. Chem. Res.*, 26(12):614–620.
- [Zaidi et al., 1997] Zaidi, F., Nath, U., and Udgaonkar, J. (1997). Multiple intermediates and transition states during protein unfolding. *Nat. Struct. Biol.*, 4(12):1016–1024.
- [Ziff, 1984] Ziff, R. (1984). Aggregation kinetics via smoluchowski’s equation. In Family, F. and Landau, D., editors, *Kinetics of aggregation and gelation*, pages 191–199. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- [Zurdo et al., 2001] Zurdo, J., Guijarro, J., Jimenez, J., Saibil, H., and Dobson, C. (2001). Dependence on solution conditions of aggregation and amyloid formation by an SH3 domain. *J. Mol. Biol.*, 311:325–340.

F. Danksagung

Selbstverständlich ist das Zustandekommen dieser Arbeit nicht ohne die großzügige Unterstützung von verschiedenen Seiten denkbar. An erster Stelle ist hier Herr Prof. Dr. Gregor Damaschun zu nennen. Ihm danke ich nicht nur die Themenstellung, die meiner Meinung nach in einen der gegenwärtig spannensten Problemkomplexe der Biophysik fällt, sondern auch die volle Unterstützung in Form wertvoller Diskussionen und ausgezeichnete Arbeitsbedingungen. Darüberhinaus hat sein Interesse am Fortschritt der Arbeit und die Unterstützung im stets wohlwollend gemeinten „doktorväterlichen“ Sinne maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Dabei wurden mir stets größtmögliche wissenschaftliche Freiräume zugestanden.

Herrn Dr. Klaus Gast bin ich für sein vorbildliches Engagement und seine stets vorhandene Bereitschaft, mich an seinem Erfahrungsschatz teilhaben zu lassen, dankbar. Klaus hat mich nicht nur in die Lichtstreuung, Spektroskopie, Chromatographie und vieles mehr eingeführt, sondern hat auch viele Messungen, die im Rahmen dieser Arbeit ausgewertet und interpretiert wurden, durchgeführt. Dabei war die gemeinsame Arbeit von einer stets freundschaftlichen Atmosphäre geprägt. Seine Freude an der Arbeit und seine wissenschaftliche Neugier wirkten besonders motivierend auf mich.

Herrn Dr. Dieter Zirwer danke ich für seine aufmunternden Worte in allen Lebenslagen und insbesondere für die Einführung in die praktischen und theoretischen Aspekte der CD-Spektroskopie, die auf seinem ungeheuren Erfahrungsschatz, der bis zu den Ursprüngen der Methode zurückreicht, basierte. Viele CD-Messungen wurden tatsächlich von ihm durchgeführt. Seinen akribisch genauen Literaturrecherchen ist es zu verdanken, dass keine für diese Arbeit relevanten Publikationen übersehen wurden.

Frau Dipl.-Phys. Hilde Damaschun und Herrn Dipl.-Ing. Reinhard Kröber danke ich für die vielen „kleinen“ Dinge, die das Leben erheblich erleichtert haben und zum erfolgreichen Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Besonders danke ich Herrn Kröber für seine Toleranz, die ihm ermöglichte meine Eigenarten in drei gemeinsamen Jahren im gleichen Arbeitsraum zu überstehen. Weiterhin danke ich ihm für die gelegentlichen „Ost-West-Dialoge“, die weit über das Fachliche hinausgingen und andere Sichtweisen eröffneten.

Herrn Dr. Heinz Fabian danke ich für die Bereitstellung von FTIR-Spektren und den FTIR-Kinetiken der Amyloidbildung der PGK zur faktoranalytischen Auswertung. Darüberhinaus bin ich Heinz für das Korrekturlesen von Manuskripten und von Teilen dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. Dieter Naumann und Herrn Dipl.-Biochem. Fabian Sokolowski danke ich für die angenehme Atmosphäre während unserer gemeinsamen Kooperation, die zu einer Publikation führte. Fabian danke ich außerdem für die Überlassung der FTIR-Kinetiken

des Prion-Proteins zur faktoranalytischen Auswertung und den direkten, unkomplizierten Umgang.

Herrn Dr. Ralf Golbik danke ich für die Bereitstellung der Barstar-Variante bei unserer gemeinsamen Kooperation, die in der Veröffentlichung einer Arbeit über die Amyloidbildung des Proteins mündete.

Frau Dr. Gudrun Lutsch danke ich für die Anfertigung und Bereitstellung sämtlicher elektronenmikroskopischer Aufnahmen in dieser Arbeit, sowie das Korrekturlesen von Manuskripten.

Herrn Prof. Dr. R. Pain danke ich für die profunde Korrektur des Manuskriptes des JMB-Papers, die manche sprachliche Grausamkeit und fachlichen Ungenauigkeit aus der Sicht eines Muttersprachlers und Experten der Proteinfaltung beseitigte.

Herrn Prof. Dr. Reinhardt Heinrich bin ich für die finanzielle Unterstützung und die Einladungen auf Workshops und zu Vorträgen im Rahmen des Graduiertenkollegs 268 zu Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. H.-G. Holzhütter danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu beurteilen. Darüberhinaus habe ich von einigen Diskussionen mit ihm im Rahmen von gemeinsamen Arbeitsgruppenseminaren profitiert.

Herrn Prof. Dr. Rainer Jaenicke danke ich für die Bereitschaft, die Arbeit zu begutachten und darüberhinaus für wertvolle Diskussionen und die Übersendung einiger seiner Arbeiten. Sie haben erheblich zur Präzisierung der bis dahin teilweise diffusen Vorstellungen meinerseits bezüglich mancher reaktionskinetischer Probleme beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Thomas Kiefhaber bin ich den Einsichten dankbar, die er mir über diverse Aspekte der chemischen Kinetik vermittelte, und die meine Vorstellungen ins rechte Licht rückten.

Roland und Wendi danke ich für die ein oder andere Heimsuchung in Berlin. Hervorzuheben sind vor allem die stets prompte Zusendung diverser PDFs vom frisch doktorierten Wendi von der ETH und seine wertvollen Tips in Bezug auf diverse Software und der Erzeugung von L^AT_EX-Dokumenten.

Stephan sei den auflockernden Tischtennisduellen und der Toleranz für manch anregende Konversation an dem ein oder anderem Abend im Madonna gedankt. Tobias sei ebenfalls in dem letzteren Punkt gedankt. Insbesondere danke ich ihm, dass er sich korrekturlesend durch diese Arbeit gequält hat.

Antje danke ich für die gemeinsame Zeit, Urlaube und Kurzbesuche vor, und auch nachdem die frisch gebackene Doktorin auf nach Paris zu neuen Horizonten aufbrach.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Mutter und Walter für die Unterstützung und Hilfe in jeglicher Form danken, die mich durch die Serpentine meines bisherigen Lebens trugen und so das Zustandekommen dieser Arbeit erst ermöglichten.

G. Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name	Andreas Johannes Modler
Anschrift	Manteuffelstr. 101 D-10997 Berlin Tel.: 030/61 62 67 26 E-mail:modler@mdc-berlin.de
Geburtsdatum	1 November, 1971
Geburtsort	Konstanz, Bundesrepublik Deutschland
Nationalität	Deutsch

Bildung

1978 - 1982	Sonnenhalde-Grundschule in Konstanz
1982 - 1991	Alexander von Humboldt-Gymnasium Konstanz
1991	allgemeine Hochschulreife, Abitur (Note 1,1)
1991 - 1994	Studium der Physik mit Abschlußziel Diplom an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
1994	Vordiplom (Note sehr gut)
1994 - 1999	Studium der Physik mit Abschlußziel Diplom an der Freien Universität Berlin
September 1997 - August 1998	Auslandsaufenthalt im Rahmen der Diplomarbeit an der Sackler Faculty of Medicine in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M.M. Kozlov, Tel Aviv Universität (Israel)

Juni 1999	Studienabschluß als <i>Diplomphysiker</i> (Note sehr gut) an der Freien Universität Berlin
Juli 1999 - Juni 2000	Assistent am Institut für Polymere (AG Polymerphysik) der ETH Zürich (Schweiz)
August 2000 - Juli 2003	Stipendiat des GK 268 am Institut für Biophysik, HU Berlin (Sprecher Prof. Dr. R. Heinrich); Doktorand in der FG Biopolymerphysik (Leiter Prof. Dr. G. Damaschun) am Max-Delbrück-Centrum Berlin-Buch
August 2003 -	wissenschaftlicher Mitarbeiter der FG Biopolymerphysik, MDC Berlin-Buch

Berufspraxis

1995 - 1999	Tutor im Physikalischen Praktikum für Naturwissenschaftler des Fachbereiches Physik der FU Berlin
-------------	---

Publikationen

A.J. Modler, K. Gast, G. Lutsch and G. Damaschun “*Assembly of Amyloid Protofibrils via Critical Oligomers - A Novel Pathway of Amyloid Formation*”, (2003), *J. Mol. Biol.*, 325, 135-148.

K. Gast, A.J. Modler, H. Damaschun, R. Kröber, G. Lutsch, D. Zirwer, R. Golbik and G. Damaschun “*Effect of Enviromental Conditions on Aggregation and Fibril Formation of Barstar*”, (2003), *Eur. Biophys. J.*, 32, 710-723.

F. Sokolowski*, A.J. Modler*, R. Masuch, D. Zirwer, M. Baier, G. Lutsch, D. Moss, K. Gast and D. Naumann “*Formation of Critical Oligomers is a Key Event during Conformational Transition of Recombinant Syrian Hamster Prion Protein*”, (2003), *J. Biol. Chem.*, 278, 40481-40492.

Die mit * gekennzeichneten Autoren trugen zu gleichen Teilen zu der Arbeit bei.

Erklärung zur Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich anderweitig mit oder ohne Erfolg nicht versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Darüberhinaus erkläre ich, dass ich die dem angestrebten Verfahren zugrundeliegende Promotionsordnung gelesen und zur Kenntnis genommen habe.